



P.B.5818 - Patentlaan 2
2280 HV Rijswijk (ZH)
☎ +31 70 340 2040
TX 31651 epo NL
FAX +31 70 340 3016

Europäisches
Patentamt
Zweigstelle
in Den Haag
Recherchen-
abteilung

European
Patent Office
Branch at
The Hague
Search
division

Office européen
des brevets
Département à
La Haye
Division de la
recherche

Khoo, Chong-Yee
D Young & Co,
21 New Fetter Lane
London EC4A 1DA
GRANDE BRETAGNE

| | |
|-------------------|-------------|
| MONEY | |
| ORDER | |
| DIARY | |
| REC'D (LONDON) | 23 DEC 2002 |
| ANSO | |
| ENTRY | |
| FOR | |

Datum/Date
20.12.02

| | |
|--|---|
| Zeichen/Ref./Réf. P011245EP CYK | Anmeldung Nr./Application No./Demande n°./Patent Nr./Patent No./Brevet n°. 00951913.3-2405-JP0005331 |
| Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Propriétaire/Titulaire JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION, et al | |

COMMUNICATION

The European Patent Office herewith transmits as an enclosure the European search report for the above-mentioned European patent application.

If applicable, copies of the documents cited in the European search report are attached.

☒ Additional set(s) of copies of the documents cited in the European search report is (are) enclosed as well.

REFUND OF THE SEARCH FEE

If applicable under Article 10 Rules relating to fees, a separate communication from the Receiving Section on the refund of the search fee will be sent later.





11-11-11



European Patent
Office

**SUPPLEMENTARY
EUROPEAN SEARCH REPORT**

Application Number
EP 00 95 1913

| DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | |
|---|--|---|---|
| Category | Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages | Relevant to claim | CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7) |
| A | ABE H ET AL: "BIOSYNTHESIS FROM GLUCONATE OF A RANDOM COPOLYESTER CONSISTING OF 3-HYDROXY-BUTYRATE AND MEDIUM-CHAIN-LENGTH 3-HYDROXYALKANOATES BY PSEUDOMONAS SP. 61-3" ① INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, BUTTERWORTH & CO., GUILDFORD, GB, vol. 16, no. 3, June 1994 (1994-06), pages 115-119, XP001068664 ISSN: 0141-8130 * the whole document * --- | 1-12 | C12N1/12 C12N9/02 C12N9/10 C12N15/09 C12P7/62 |
| A | STEINBUCHEL A ET AL: "Bacterial and other biological systems for polyester production" ② TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 16, no. 10, 1 October 1998 (1998-10-01), pages 419-427, XP004145649 ISSN: 0167-7799 Figures 1,2 ----- | 1-12 | <div>TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7)</div> <div>C12P C12N C12R</div> |
| The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search. | | | |
| Place of search MUNICH | | Date of completion of the search 16 December 2002 | Examiner Seranski, P |
| <div>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</div> <div>X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document</div> <div>T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document</div> | | | |

INTERNATIO SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05331

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N1/12, C12N9/02, C12N9/10, C12N15/09, C12P7/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N1/12, C12N9/02, C12N9/10, C12N15/09, C12P7/62

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | US, 5602321, A (Monsanto Company), 11 February, 1997 (11.02.97) & WO, 9412014, A1 & EP, 625006, A1 | 1-12 |
| A | EP, 897005, A1 (Inst. Physical & Chemical Research), 20 October, 1998 (20.10.98) & JP, 10-276781, A & US, 5968805, A | 1-12 |
| A | HIROMI MATSUSAKI et al. "Cloning and Molecular Analysis of the Poly (3-hydroxybutyrate) and Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) Biosynthesis Genes in Pseudomonas sp. Strain 61-3", JOURNAL OF BACTERIOLOGY (1998) Vol.180 No.24 p.6459-6467 | 1-12 |
| A | Oliver P. Peoples et al. "Poly-β-hydroxybutyrate Biosynthesis in Alcaligenes eutrophus H16", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (1989) Vol.264 No.26 p.15293-15297 | 1-12 |
| PX | H.Matusaki et al. "Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant bacteria expressing the PHA synthase gene | 1-12 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search
17 November, 2000 (17.11.00)Date of mailing of the international search report
28 November, 2000 (28.11.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05331

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| | <p>phaC1 from Pseudomonas sp.61-3"</p> <p>Appl. Microbiol. Biotechnol. (2000) Vol.53 No.4 p.401-409</p> | |

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

| | | | |
|--------------------------|---------------------------|---|--|
| 出願人又は代理人 の書類記号 | PH- 1046-PCT | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/JPO0/05331 | 国際出願日 (日.月.年) 09.08.00 | 優先日 (日.月.年) 09.08.99 | |
| 出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団 | | | |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl⁷ C 1 2 N 1 / 1 2, C 1 2 N 9 / 0 2, C 1 2 N 9 / 1 0, C 1 2 N 1 5 / 0 9, C 1 2 P 7 / 6 2

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl⁷ C 1 2 N 1 / 1 2, C 1 2 N 9 / 0 2, C 1 2 N 9 / 1 0, C 1 2 N 1 5 / 0 9, C 1 2 P 7 / 6 2

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| A | US, 5602321, A (Monsanto Company) 11.02月. 1997 (11.02.97) & WO, 9412014, A1 & EP, 625006, A1 | 1-12 |
| A | EP, 897005, A1 (Inst. Physical & Chemical Research) 20.10月. 1998 (20.10.98) & JP, 10-276781, A & US, 5968805, A | 1-12 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
17. 11. 00

国際調査報告の発送日
28.11.00

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
小暮 道明



4 B 9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | HIROMI MATSUSAKI et al. "Cloning and Molecular Analysis of the Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) Biosynthesis Genes in <i>Pseudomonas</i> sp. Strain 61-3" JOURNAL OF BACTERIOLOGY (1998) Vol.180 No. 24 p. 6459-6467 | 1 - 12 |
| A | Oliver P. Peoples et al. "Poly- β -hydroxybutyrate Biosynthesis in <i>Alcaligenes eutrophus</i> H16" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (1989) Vol. 264 No. 26 p. 15293-15297 | 1 - 12 |
| PX | H. Matusaki et al. "Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant bacteria expressing the PHA synthase gene <i>phaC1</i> from <i>Pseudomonas</i> sp. 61-3" Appl Microbiol Biotechnol (2000) Vol. 53 No. 4 p. 401-409 | 1 - 12 |

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 2 月 15 日 (15.02.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/11014 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 1/12, (72) 発明者; および
9/02, 9/10, 15/09, C12P 7/62 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 土肥義治 (DOI, Yoshiharu) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内 Saitama (JP). 松崎弘美 (MAT-SUSAKI, Hiromi) [JP/JP]; 〒351-0012 埼玉県朝霞市栄町4-5-16-203 Saitama (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/05331
- (22) 国際出願日: 2000 年 8 月 9 日 (09.08.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平11/225102 1999 年 8 月 9 日 (09.08.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP). 理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3F Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): JP, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING COPOLYMERIZED POLYESTER

(54) 発明の名称: 共重合ポリエステル製造方法

(57) Abstract: A transformant with the disruption of a polyhydroxybutanoate synthase gene which contains a recombinant vector containing a polyester polymerase gene, β -ketothiolase gene and NADPH-acetoacetyl-CoA reductase gene.

(57) 要約:

ポリエステル重合酵素遺伝子、 β -ケトチオラーゼ遺伝子及びNADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ遺伝子を含む組換えベクターを含む、ポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子が破壊された形質転換体。

WO 01/11014 A1



02

.

.

.

.

.

明細書

共重合ポリエステルの製造方法

技術分野

本発明は、ポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子が破壊された宿主を、ポリエステル重合酵素遺伝子、 β -ケトチオラーゼ遺伝子及びNADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ遺伝子を含む組換えベクターで形質転換した形質転換体及び該形質転換体による共重合ポリエステルの製造方法に関する。

背景技術

数多くの微生物は、ポリ-3-ヒドロキシブタン酸（P(3HB)）を生合成し、エネルギーの貯蔵物質として体内に微粒子状で蓄えることが知られている。微生物体内から抽出したP(3HB)は、180℃程度に融解温度をもつ熱可塑性高分子であり、優れた生分解性と生体適合性を示すことから、環境を保全する「グリーン」プラスチックとして注目されている。また、P(3HB)は各種の微生物を用いて糖や植物油などの再生可能な炭素資源から合成できる。しかしながら、P(3HB)は、高結晶性高分子であるために耐衝撃性に劣るという物性上の問題があり、実用化が見送られてきた。しかし、鎖長の長い3-ヒドロキシアルカン酸（3HA）ユニットとの共重合体を作製することで耐衝撃性が向上し、柔軟な材料となる。例えば、ラルストニア・ユートロファ（*Ralstonia eutropha*）（旧名アルカリゲネス・ユートロファス（*Alcaligenes eutrophus*））を用いて炭素源にグルコースとプロピオン酸を与えることで、炭素数5の3-ヒドロキシ吉草酸（3HV）とのランダム共重合ポリエステル、P(3HB-co-3HV)の合成が行われており、「Biopol」の商標で知られている〔欧州特許出願第0052459号(1981)〕。アエロモナス・キャビエ（*Aeromonas caviae*）による3HBと3-ヒドロキシヘキサン酸（3HH）との2成分共重合ポリエステル P(3HB-co-3HH)およびその製造法について、研究、開発がなされ、たとえば、特開平5-93049号公報および特開平7-265065号公報にそれぞれ記載されている。P(3HB-co-3HH)共重合体は、3HH

ユニット分率の増加とともに結晶化度が低下するために、柔軟な高分子材料となり、熱安定性や成形性にも優れ、強い系や透明でしなやかなフィルムにも加工できることが明らかにされている [Y. Doi, S. Kitamura, H. Abe, *Macromolecules* 28, 4822-4823 (1995)]。

また、シュードモナス・エスピー61-3株 (*Pseudomonas* sp. JCM 10015) は、炭素数 4 ~ 12 といった幅広い 3HA ユニットの基質とすることができる、PhaC1 [特開平10-276781号公報、*J. Bacteriol.*, 180, 6459-6467, 1998] や PhaC2 [J. Bacteriol., 180, 6459-6467, 1998] などのポリエステル重合酵素を有することが知られている。しかしながら、シュードモナス・エスピー61-3株によって生産される共重合ポリエステルは、3HB分率が低いために、合成された共重合ポリエステルはアモルファスとなりプラスチック材料としては好ましいものとはいえない。

発明の開示

本発明は、ポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子が破壊された宿主を、ポリエステル重合酵素遺伝子、 β -ケトチオラーゼ遺伝子及びNADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ遺伝子を含む組換えベクターで形質転換した形質転換体及び該形質転換体を用いて3HB分率の高い共重合ポリエステルの製造方法を提供することを目的とする。

本発明者は、上記課題に基づいて鋭意研究を行った結果、ポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子が破壊されたシュードモナス・エスピー61-3株を、シュードモナス・エスピー61-3株由来ポリエステル重合酵素 1 遺伝子 (phaC1 遺伝子)、ラルストニア・ユートロファ由来 β -ケトチオラーゼ遺伝子 (phbA 遺伝子) およびラルストニア・ユートロファ由来NADPH-アセトアセチルCoAリダクターゼ遺伝子 (phbB 遺伝子) を含む組換えベクターで形質転換した形質転換体が、炭素数 4 ~ 12 の 3HA ユニットの含む、3HBのモル分率が 80 ~ 95% の P(3HB-co-3HA) を生産することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、ポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子が破壊された宿主を、ポリエステル重合酵素遺伝子、 β -ケトチオラーゼ遺伝子及びNADPH-

アセトアセチルCoAレダクターゼ遺伝子を含有する組換えベクターで形質転換した形質転換体である。

さらに、本発明は、ポリエステル重合酵素遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAからなる、前記形質転換体である。

(a) 配列番号 2 又は配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号 2 又は配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつポリエステル重合酵素活性を有するタンパク質

さらに、本発明は、ポリエステル重合酵素遺伝子が以下の(a)又は(b)のDNAからなる、前記形質転換体である。

(a) 配列番号 1 又は配列番号 3 で表される塩基配列を含むDNA

(b) 配列番号 1 又は配列番号 3 で表される塩基配列を含むDNAとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズし、かつポリエステル重合酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA

さらに、本発明は、 β -ケトチオラーゼ遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAからなる、前記形質転換体である。

(a) 配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号 6 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ β -ケトチオラーゼ活性を有するタンパク質

さらに、本発明は、 β -ケトチオラーゼ遺伝子が以下の(a)又は(b)のDNAからなる、前記形質転換体である。

(a) 配列番号 5 で表される塩基配列を含むDNA

(b) 配列番号 5 で表される塩基配列を含むDNAとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズし、かつ β -ケトチオラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

さらに、本発明は、NADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAからなる、前記形質転換体である。

(a) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ NADPH-アセトアセチル CoA レダクターゼ活性を有するタンパク質

さらに、本発明は、NADPH-アセトアセチル CoA レダクターゼ遺伝子が以下の (a) 又は (b) の DNA からなる、前記形質転換体である。

(a) 配列番号 7 で表される塩基配列を含む DNA

(b) 配列番号 7 で表される塩基配列を含む DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ NADPH-アセトアセチル CoA レダクターゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA

さらに、本発明は、形質転換体がシュードモナス属又はラルストニア属に属する細菌である前記形質転換体である。ここで、シュードモナス属に属する細菌としては、シュードモナス・エスピー 61-3 株が挙げられる。

さらに、本発明は、前記形質転換体を培養し、得られる培養物からポリエステル(例えば、炭素数 4 ~ 12 の 3-ヒドロキシアルカン酸ユニットからなるポリエステル)を採取することを特徴とする共重合ポリエステルの製造方法である。ここで、製造されるポリエステルとしては、炭素数 4 ~ 12 の 3-ヒドロキシアルカン酸ユニット(例えば、3-ヒドロキシアルカン酸ユニットの 80 ~ 95 mol % が 3-ヒドロキシブタン酸)からなるポリエステルが挙げられる。

以下、本発明を詳細に説明する。

1. 形質転換用の宿主

形質転換に用いることができる宿主としては、組換えベクター中に含まれる各遺伝子を発現できるものであれば特に限定されず、例えば、シュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・エスピー 61-3 株(*Pseudomonas* sp. 61-3)などのシュードモナス属に属する細菌、ラルストニア・ユートロファ(*Ralstonia eutropha*)などのラルストニア属に属する細菌、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)などのバチルス(*Bacillus*)属に属する細菌、大腸菌(*Escherichia coli*)などのエッシェリヒア属に属する細菌、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)などのサッカロミセス(*Saccharom*

yses)属に属する酵母、カンジダ・マルトーサ(*Candida maltosa*)などのカンジダ(*Candida*)属に属する酵母、C O S細胞、C H O細胞等の動物細胞などが挙げられる。

特に、所望の組成のポリエステルを宿主細胞に生産させるために、宿主細胞中に元来存在する特定のポリエステル重合酵素遺伝子を破壊した細胞を用いることもできる。図1には、ポリヒドロキシブタン酸(P(3HB))及び3-ヒドロキシブタン酸と3-ヒドロキシアルカン酸との共重合物(P(3HB-co-3HA))の生成経路を示す。

例えば、シュードモナス・エスピー61-3株のポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子破壊株は、構造遺伝子の末端欠失等により変異させたポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子を、シュードモナス・エスピー61-3株中に導入し、該変異ポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子と染色体上のポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子との間で相長的組換えを起こさせることにより構築することができる。ポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子が破壊されていることの確認は、該遺伝子の一部をプローブとして用いるサザンハイブリダイゼーションによって、ハイブリダイズするバンドが、野性株由来のバンドに比べて予想される位置にシフトしていることを調べることによって行うことができる。

2. 組換えベクター

本発明において用いられる組換えベクターは、ポリエステル重合酵素遺伝子、 β -ケトチオラーゼ遺伝子及びNADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ遺伝子を適当な発現ベクターに連結(挿入)することにより得ることができる。

ポリエステル重合酵素遺伝子としては、シュードモナス・エスピー61-3株由来のphaC1遺伝子又はphaC2遺伝子などが挙げられる。phaC1遺伝子の塩基配列を配列番号1に、phaC1遺伝子がコードするポリエステル重合酵素のアミノ酸配列を配列番号2に示すが、これらのアミノ酸配列を含むタンパク質がポリエステル重合酵素活性を有する限り、当該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてよい。例えば、配列番号2又は4で表されるアミノ酸配列の1個、好ましくは2～5個、さらに好ましく

は5～10個のアミノ酸が欠失してもよく、又は配列番号2又は4で表されるアミノ酸配列に1個、好ましくは2～5個、さらに好ましくは5～10個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号2又は4で表されるアミノ酸配列の1個、好ましくは2～5個、さらに好ましくは5～10個のアミノ酸が置換してもよい。また、配列番号1又は3で表される塩基配列を含むDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズすることができるDNAも、該DNAがポリエステル重合酵素活性を有するタンパク質をコードする限り本発明に用いることができる。ストリンジエントな条件とは、例えば、温度が60～68℃、好ましくは55～68℃であり、ナトリウム濃度が250～350mM、好ましくは300～400mMでの条件をいう。

また、 β -ケトチオラーゼ遺伝子としては、ラルストニア・ユートロファ由来のphbA遺伝子などが挙げられる。phbA遺伝子の塩基配列を配列番号5に、phbA遺伝子がコードする β -ケトチオラーゼのアミノ酸配列を配列番号6に示すが、これらのアミノ酸配列を含むタンパク質が β -ケトチオラーゼ活性を有する限り、当該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じててもよい。例えば、配列番号6で表されるアミノ酸配列の1個、好ましくは2～5個、さらに好ましくは5～10個のアミノ酸が欠失してもよく、又は配列番号6で表されるアミノ酸配列に1個、好ましくは2～5個、さらに好ましくは5～10個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号6で表されるアミノ酸配列の1個、好ましくは2～5個、さらに好ましくは5～10個のアミノ酸が置換してもよい。また、配列番号5で表される塩基配列を含むDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズすることができるDNAも、該DNAが β -ケトチオラーゼ活性を有するタンパク質をコードする限り本発明に用いることができる。ストリンジエントな条件とは、例えば、温度が60～68℃、好ましくは55～68℃であり、ナトリウム濃度が250～350mM、好ましくは300～400mMでの条件をいう。

また、NADPH-アセトアセチルCoAリダクターゼ遺伝子としては、ラルストニア・ユートロファ由来のphbB遺伝子などが挙げられる。phbB遺伝子の塩基配列を配列番号7に、phbB遺伝子がコードするNADPH-アセトアセチルCoAリダク

一ゼのアミノ酸配列を配列番号 8 に示すが、これらのアミノ酸配列を含むタンパク質がNADPH-アセトアセチルCoAリダクターゼ活性を有する限り、当該アミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じててもよい。例えば、配列番号 8 で表されるアミノ酸配列の 1 個、好ましくは 2 ～ 5 個、さらに好ましくは 5 ～ 10 個のアミノ酸が欠失してもよく、又は配列番号 8 で表されるアミノ酸配列に 1 個、好ましくは 2 ～ 5 個、さらに好ましくは 5 ～ 10 個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号 8 で表されるアミノ酸配列の 1 個、好ましくは 2 ～ 5 個、さらに好ましくは 5 ～ 10 個のアミノ酸が置換してもよい。また、配列番号 7 で表される塩基配列を含むDNAとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズすることができるDNAも、該DNAがNADPH-アセトアセチルCoAリダクターゼ活性を有するタンパク質をコードする限り本発明に用いることができる。ストリンジেন্টな条件とは、例えば、温度が 60 ～ 68℃、好ましくは 55 ～ 68℃であり、ナトリウム濃度が 250 ～ 350mM、好ましくは 300 ～ 400mMでの条件をいう。

前記の各遺伝子を挿入するためのベクターは、宿主中で自立複製可能なものであれば特に限定されず、プラスミドDNAやファージDNAをベクターとして用いることができる。例えば、大腸菌を宿主として用いる場合には、pBR322、pUC18、pBluescript II等のプラスミドDNA、EMBL3、M13、 λ gt11等のファージDNA等を、酵母を宿主として用いる場合は、YEpl3、YCp50等を、動物細胞を宿主として用いる場合は、pcDNA1、pcDNA1/Amp (インビトロジェン社)等をベクターとして用いることができる。また、ラルストニア属に属する細菌、シュードモナス属に属する細菌等を宿主として用いる場合には、広範囲の宿主において複製・保持される RK2複製起点を有する pLA2917(ATCC37355)やRSF1010複製起点を有する pJRD215(ATCC 37533)等をベクターとして用いることができる。

ベクターへの遺伝子の挿入は、上記遺伝子を含むDNA断片と、制限酵素消化されたベクターDNA断片とを、市販のDNAリガーゼを用いて連結反応させることにより行うことができる。ここで、上記遺伝子は、該遺伝子の機能が発揮されるようにベクターに挿入されることが必要である。特に、遺伝子が発現されるためには、プロモーターの下流に遺伝子を挿入することが必要である。プロモ

ーターとしては、宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えば、大腸菌を宿主として用いる場合には、trpプロモーター、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター、T7プロモーターなどを、酵母を宿主として用いる場合には、gal 1プロモーター、gal 10プロモーターなどを用いることができる。

特に、シュードモナス属に属する細菌を宿主として用いる場合には、プロモーターとして、phaCl_{ps}遺伝子上流やphbCAB_{Re}オペロン上流のプロモーターを含むと考えられる領域などを用いることができる。なお、phaCl_{ps}遺伝子上流の塩基配列を配列番号9に、phbCAB_{Re}オペロン上流の塩基配列を配列番号10に示す。

また、本発明のベクターには、必要に応じて、ターミネーター、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、リボゾーム結合配列（SD配列）などを連結することができる。なお、選択マーカーとしては、例えばアンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子等が挙げられる。特に、シュードモナス属に属する細菌を宿主として用いる場合には、ターミネーターとして、phbCAB_{Re}オペロン下流のターミネーターを含むと考えられる領域などを用いることができる。なお、phbCAB_{Re}オペロン下流の塩基配列を配列番号11に示す。

3. 形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、上記2において得られた組換えベクターを上記1の宿主細胞中に導入することにより得ることができる。細菌への組み換え体DNAの導入方法としては、例えばカルシウムイオンを用いる方法 [Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 1.8.1頁, 1994年] やエレクトロポレーション法 [Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 1.8.4 頁, 1994年] 等が挙げられる。また、シュードモナス属に属する細菌へのプラスミドの導入は、接合伝達法により行うことができる [Friedrich et al. : J. Bacteriol. 147:198-205(1981)]。

酵母への組換え体DNAの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション

法 [Methods. Enzymol., 194, 182-187(1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929-1933(1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163-168(1983)] 等が挙げられる。動物細胞への組換え体DNAの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法等が挙げられる。

なお、ポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子が破壊されたシュードモナス・エスピー61-3株を、プラスミドpJBB49-phbで形質転換した株 (Pseudomonas sp. BB49) はFERM BP-7263として、プラスミドpJKSc46-phaで形質転換した株 (Pseudomonas sp. KSc46) はFERM BP-7264として、およびpJKSc54-phabで形質転換した株 (Pseudomonas sp. KSc54) はFERM BP-7265として、工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に、平成11年8月5日付で寄託されている。

4. ポリエステルの製造

ポリエステルの製造は、本発明の形質転換体を培地で培養し、培養菌体又は培養物中に共重合ポリエステルを生成蓄積させ、該培養菌体又は培養物から該ポリエステルを採取することにより行われる。本発明の形質転換体を培地で培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

ラルストニア属に属する細菌やシュードモナス属に属する細菌等を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源を与え、窒素源、無機塩類、その他の有機栄養源のいずれかを制限した培地、例えば窒素源を0.01~0.1%に制限した培地が挙げられる。また、培養温度は25~37℃の範囲で好氣的に2~7日培養することによりポリエステルを菌体内に蓄積させ、その後、このポリエステルを回収する。

炭素源としては、例えばグルコース、フラクトース、スクロース、マルトース等の炭水化物が挙げられる。また、炭素数4以上の油脂関連物質を炭素源とすることもできる。炭素数4以上の油脂関連物質としては、コーン油、大豆油、サフラワー油、サンフラワー油、オリーブ油、ヤシ油、パーム油、ナタネ油、魚油、鯨油、豚油又は牛油などの天然油脂、ブタン酸、ペンタン酸、ヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、オレイン酸、パルミチン酸、リノレ

ン酸、リノール酸若しくはミリスチン酸等の脂肪酸又はこれら脂肪酸のエステル、オクタノール、ラウリルアルコール、オレイルアルコール若しくはパルミチルアルコール等又はこれらアルコールのエステル等が挙げられる。

窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー等が挙げられる。無機物としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム等が挙げられる。

培養は、通常振盪培養などの好氣的条件下、25～37℃で発現誘導後24時間以上行う。培養中は、カナマイシン、アンピシリン、テトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、インデューサーを培地に添加することもできる。例えば、イソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド (IPTG)、インドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加することができる。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えばRPMI-1640、DMEM培地又はこれらの培地にウシ胎児血清を添加した培地が用いられる。培養は、通常5%CO₂存在下、30～37℃で14～28日間行う。培養中はカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

本発明において、ポリエステルの精製は、例えば以下のように行うことができる。培養液から遠心分離によって形質転換体を集め、蒸留水で洗浄した後、乾燥させる。その後、クロロホルムに乾燥形質転換体を懸濁し、加熱することによってポリエステルを抽出する。濾過によって残渣を取り除く。このクロロホルム溶液にメタノールを加えてポリエステルを沈殿させる。濾過や遠心分離によって上澄み液を除去した後、乾燥して精製ポリエステルを得る。得られたポリエステルは、生分解性の糸やフィルム、各種容器の材料として利用することができる。得られたポリエステルが目的のものであることの確認は、通常の方法、例えばガスクロマトグラフ法や核磁気共鳴法等により行う。

図面の簡単な説明

図1は、ポリエステルの生成経路を示した図である。

図2は、組換えベクターの構築手順を示した図である。

図3は、シュードモナス・エスピー61-3株(*phbC::tet*)の形質転換に用いた組換えベクターの構造を示した図である。

図4は、本発明により得られた共重合ポリエステルフィルムの引っ張り試験の結果を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明は、これら実施例にその技術的範囲を限定するものではない。

〔実施例1〕シュードモナス・エスピー61-3株のポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子破壊株の構築

シュードモナス・エスピー61-3株 (*Pseudomonas* sp. JCM 10015) は、炭素数4～12の幅広い基質を利用できるポリヒドロキシアリカン酸合成酵素(PhaC1及びPhaC2)に加えて、ポリヒドロキシブタン酸合成酵素(PhbC)を保有するため、この菌株は、3-ヒドロキシブタン酸を唯一のユニットとするポリエステル (P(3HB)) と、炭素数4～12の3HAユニットが取り込まれた共重合ポリエステル (P(3HB-co-3HA)) とのブレンド体を合成する。3HBユニットは、PhaC1やPhaC2よりも該ユニットとの親和性が高いPhbCの、基質として優先的に利用されやすく、そのため、3HB分率の高い共重合ポリエステルは合成されない。そこで、シュードモナス・エスピー61-3株のポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子破壊株の構築を行った。

すなわち、まずシュードモナス・エスピー61-3株のポリヒドロキシブタン酸合成酵素をコードする遺伝子(*phbC_{ps}*遺伝子)の5'末端を342bp及び3'末端を418bpを欠失させることにより、941bpの欠失型ポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子断片(EcoRI-PstI断片)を作製した。次いで、得られたEcoRI-PstI断片を、pBR322のEcoRI、PstI部位に連結し、ポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子破壊用のプラスミドpBREP9(Tc^r)を作製した。得られたプラスミドpBREP9(Tc^r)

を、272mMのショ糖を含む8mM HEPES緩衝液(pH7.2)中に懸濁したシュードモナス・エスピー61-3株にエレクトロポレーション(条件:7.5kV/cm、800 Ω 、25 μ F)により導入した。phbC_{ps}遺伝子破壊株(phbC::tet)は、テトラサクリン含有LB培地上で生育できる株をスクリーニングし、いくつかのスクリーニング株及び野性株から調製した染色体DNAを適当な制限酵素で消化後、phbC_{ps}遺伝子の一部をプローブとするサザンハイブリダイゼーションを行って、予測される分子量の位置にシフトしたバンドを形成する株を選択することによって得た。

〔実施例2〕組換えベクターの作製

組換えベクターの作製手順を図2に示した。DNA断片の切断及び連結等は常法[Sambrook et al.:Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989]に従って行った。図2に記載のように、pBSEX22及びpGEM'-phbCABを出発プラスミドとして用いた。ここで、pBSEX22は、シュードモナス・エスピー61-3株のphaC1遺伝子を含む2.2-kb EcoRI-XbaI領域をpBluescript II KS+に挿入することにより作製し、pGEM'-phbCABは、ラルストニア・ユートロファH16(ATCC 17699)のphbCAB遺伝子[J. Biol. Chem., 264, 15293-15297, 1989; J. Biol. Chem., 264, 15298-15303, 1989]をPCRで増幅し、得られたPCR断片を、NdeIとPstI部位を破壊したpGEM-T (Promega社)ベクターに挿入することにより作製した。

シュードモナス・エスピー61-3株中で複製可能な形態にするために、組換えベクター構築の最後の工程において、目的の遺伝子をコードするDNA断片を、シュードモナス・エスピー61-3株中で複製可能なプラスミドpJRD215(ATCC37533)に挿入・連結した。すなわち、プラスミドpJASc22は、pBSEX22から、シュードモナス・エスピー61-3株由来ポリエステル重合酵素1遺伝子(phaC1_{ps}遺伝子)及び該遺伝子のプロモーター(P_{ps}プロモーター)を含むApaI-SacI断片を切り出し、該断片を、pJRD215のApaI、SacI部位に連結・挿入することにより作製した。また、プラスミドpJBB49-phbは、ラルストニア・ユートロファ由来phbCAB_{ke}オペロンプロモーター(P_{ke}プロモーター)、phaC1_{ps}遺伝子、ラルストニア・ユートロファ由来 β -ケトチオラーゼ遺伝子(phbA_{ke}遺伝子)、ラルストニア・ユ

ートロファ由来NADPH-アセトアセチルCoAリダクターゼ遺伝子($phbB_{Re}$ 遺伝子)及びラルストニア・ユートロファ由来 $phbCAB_{Re}$ オペロンターミネーター(T_{Re} ターミネーター)を含むBamHI-BamHI断片を、pJRD215のBamHI部位に連結・挿入することによりを作製した。そして、プラスミドpJKSc46-phaは、 P_{PS} プロモーター、 $phaCl_{PS}$ 遺伝子、 $phbA_{Re}$ 遺伝子、 $phbB_{Re}$ 遺伝子及び T_{Re} ターミネーターを含むKpnI-SacI断片を、pJRD215のKpnI、SacI部位に連結・挿入することによりを作製した。さらに、プラスミドpJKSc54-phabは、 P_{PS} プロモーター、 $phaCl_{PS}$ 遺伝子、 P_{Re} プロモーター、 $phbA_{Re}$ 遺伝子、 $phbB_{Re}$ 遺伝子及び T_{Re} ターミネーターを含むKpnI-SacI断片を、pJRD215のKpnI、SacI部位に連結・挿入することによりを作製した。このようにて得られた4種類のプラスミドの構造を図3に示した。

〔実施例3〕 シュードモナス・エスピー61-3株($phbC::tet$)形質転換体の作製

実施例1において得られたシュードモナス・エスピー61-3株の $phbC_{PS}$ 遺伝子破壊株($phbC::tet$)に、実施例2において得られたプラスミドを、接合伝達法により導入して形質転換体を作製した。すなわち、まず4種類のプラスミドpJASc22、pJBB49-phb、pJKSc46-pha、pJKSc54-phabをそれぞれ大腸菌S17-1株に塩化カルシウム法によって形質転換した。次いで得られた形質転換体及びシュードモナス・エスピー61-3株($phbC::tet$)株をそれぞれLB培地1.5ml中で、30°Cで一晩培養した。次に、大腸菌の培養物0.1ml及びシュードモナス・エスピー61-3株($phbC::tet$)株の培養物0.1mlを混合し、30°Cで4時間培養した。そして、菌体混合液をMS寒天培地(0.9%リン酸二ナトリウム、0.15%リン酸一カリウム、0.05%塩化アンモニウム、2%グルコース、0.1%(v/v) Trace element solution ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.218g、 $FeCl_3$ 9.7g、 $CaCl_2$ 7.8g、 $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.118g、 $CrCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.105g、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.156gを0.1N塩酸1 literに溶解したもの)、1.5%寒天、50mg/lカナマイシン、12.5mg/lテトラサイクリン)に塗布し、30°Cで2～5日間培養した。

MS寒天培地上で増殖したコロニーを単離することによって形質転換体を得た。pJASc22、pJBB49-phb、pJKSc46-pha、および、pJKSc54-phabを有する形質転換体をそれぞれ、シュードモナス・エスピーASc22株、BB49株、KSc46株、および、

KSc54株と命名した。

〔実施例4〕 シュードモナス・エスピー61-3株(phbC::tet)形質転換体による
ポリエステル合成

実施例3において得られた形質転換体を用いてポリエステル生産を行った。
すなわち、シュードモナス・エスピー61-3株(phbC::tet)株、ASc22株、BB49株、
KSc46株、KSc54株を、それぞれ、2%グルコースを含む100mlのMS培地に植菌し、
坂口フラスコ中、28℃で48時間培養した。遠心分離によって菌体を回収し、蒸
留水で洗浄後、凍結乾燥し、乾燥菌体重量、ポリエステル含量、ポリエステル
組成を測定した。

すなわち、乾燥菌体10～30mgに2mlの硫酸－メタノール混液（15：85）と2
mlのクロロホルムを添加して密栓し、100℃で140分間加熱することにより、
菌体内ポリエステル分解物のメチルエステルを得た。これに1mlの蒸留水を添
加して激しく攪拌した。静置して二層に分離させた後、下層の有機層を取り出
し、その組成をキャピラリーガスクロマトグラフィーによって分析した。ガス
クロマトグラフは島津製作所製GC-14A、キャピラリーカラムはGLサイエンス
社製NEUTRA BOND-1（カラム長25m、カラム内径0.25mm、液膜厚0.4 μm）を
用いた。温度条件は、初発温度100℃から8℃／分の速度で昇温した。得られ
た結果を表1に示した。

表1

シュードモナス・エスピー61-3株(phbC::tet)における共重合ポリエステルの生産

| 菌株 | 乾燥菌体重量 (g/l) | ポリエステル 含量(重量%) | ポリエステル組成 (mol%) | | | | | |
|-----------|-----------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | | | 3HB (C ₄) | 3HHx (C ₆) | 3HO (C ₈) | 3HD (C ₁₀) | 3HDD (C ₁₂) | 3H5DD (C ₁₂) |
| phbC::tet | 0.7 | 4 | 36 | 0 | 6 | 23 | 20 | 15 |
| Asc22 | 0.7 | 6 | 64 | 0 | 2 | 15 | 11 | 8 |
| BB49 | 1.7 | 38 | 92 | 0 | 1 | 4 | 2 | 1 |
| Ksc46 | 2.6 | 37 | 81 | 0 | 1 | 9 | 5 | 4 |
| Ksc54 | 2.5 | 45 | 92 | 0 | 1 | 3 | 3 | 1 |

注) 3HB: 3-ヒドロキシブタン酸; 3HHx: 3-ヒドロキシヘキサン酸; 3HO: 3-ヒドロキシオクタン酸;
3HD: 3-ヒドロキシデカン酸; 3HDD: 3-ヒドロキシドデカン酸; 3H5DD: 3-ヒドロキシ-cis-5-ドデカン酸

表1からも明らかなように、各組換え菌は、2%グルコースを炭素源として5～50重量%程度のポリエステルを比較的効率的に蓄積した。シュードモナス・エスピー61-3株(phbC::tet)によって生産されたポリエステルは、3HB分率が36mol%からなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HA)であった。これに対し、phaC1遺伝子が導入されたASc22株によって生産されたポリエステルは、3HB分率が前記ポリエステルに比べわずかに増加し、約64mol%であった。一方、ラルストニア・ユートロファ由来のphbA遺伝子及びphbB遺伝子が導入されたBB49株、KSc46株、KSc54株によって生産されたポリエステルは、81～92mol%と高い3HB分率を有していた。また、これらの株におけるポリエステルの菌体内蓄積率は、37～45重量%と高い値を示した。一般に、高3HB分率の共重合ポリエステルP(3HB-co-3HA)は、P(3HB)とは異なり、柔軟性を有すると共に耐衝撃性に優れている。上記菌株を用いることにより、より高い効率で、より実用的な生分解性プラスチックを製造できることが分かった。

〔実施例5〕 共重合ポリエステルの機械的強度

本発明において得られた高3HB分率の共重合ポリエステルの機械的強度を調べた。すなわち、まず、94mol%の3-ヒドロキシブタン酸(炭素数：4)及び6mol%の3-ヒドロキシアルカン酸(炭素数：6～12)からなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HA)を用いて、厚さ約150 μ mのフィルムを作製した。得られたフィルムを、文献に記載の方法[Doi, Y. et al. : Macromolecules 28:4822(1995)]に従って、室温下、100mm/分の引っ張り速度による引っ張り試験を行った。その結果を、図4に示した。図4のカーブに基づいて、引っ張り強度、ヤング率、破壊伸び率を算出したところ、それぞれ、17MPa、0.22GPa及び680%であった。この値は、汎用されている石油を原料として作られる低密度ポリエチレン(film grade; 10 MPa, 0.17GPa, 620%)と同等のものであった。また、従来知られている生分解性共重合ポリエステルのP(3HB-co-10%4HB)[Saito, Y. et al. : Int. J. Biol. Macromol., 16:99(1994)]及びP(3HB-co-10%3HHx)[Doi, Y. et al. : Macromolecules 28:4822(1995)]の引っ張り強度及び破壊伸び率はそれぞれ、24MPa及び242%、並びに21MPa及び400%であることから、本発明において得られる生分解性共重合ポリエステルは、従来のポ

リエステルと比較して、優れた柔軟性を有していることがわかった。

以上のことより、本発明によって、石油系プラスチックと同等な機械的強度を有し、且つ従来の生分解性プラスチックにはない高い柔軟性を有する生分解性プラスチックを製造できることがわかった。

産業上の利用可能性

本発明の製造方法は、炭素数4～12の3-ヒドロキシアルカン酸ユニットからなり、特に3HB分率の高い共重合ポリエステル、P(3HB-co-3HA)を合成することである。このようなポリエステルは、熱安定性や成形性に優れており、P(3HB)に比べて耐衝撃性に優れた生分解性プラスチックとなる点で有用である。

請求の範囲

1. ポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子が破壊された宿主を、ポリエステル重合酵素遺伝子、 β -ケトチオラーゼ遺伝子及びNADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ遺伝子を含む組換えベクターで形質転換した形質転換体。
2. ポリエステル重合酵素遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAからなる、請求項1記載の形質転換体。
 - (a) 配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質
 - (b) 配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつポリエステル重合酵素活性を有するタンパク質
3. ポリエステル重合酵素遺伝子が以下の(a)又は(b)のDNAからなる、請求項1記載の形質転換体。
 - (a) 配列番号1又は配列番号3で表される塩基配列を含むDNA
 - (b) 配列番号1又は配列番号3で表される塩基配列を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつポリエステル重合酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA
4. β -ケトチオラーゼ遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAからなる、請求項1記載の形質転換体。
 - (a) 配列番号6で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質
 - (b) 配列番号6で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ β -ケトチオラーゼ活性を有するタンパク質
5. β -ケトチオラーゼ遺伝子が以下の(a)又は(b)のDNAからなる、請求項1記載の形質転換体。
 - (a) 配列番号5で表される塩基配列を含むDNA
 - (b) 配列番号5で表される塩基配列を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ β -ケトチオラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

6. NADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAからなる、請求項1記載の形質転換体。

(a) 配列番号8で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号8で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつNADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ活性を有するタンパク質

7. NADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ遺伝子が以下の(a)又は(b)のDNAからなる、請求項1記載の形質転換体。

(a) 配列番号7で表される塩基配列を含むDNA

(b) 配列番号7で表される塩基配列を含むDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつNADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

8. 形質転換体がシュードモナス属又はラルストニア属に属する細菌である、請求項1記載の形質転換体。

9. シュードモナス属に属する細菌がシュードモナス・エスピー61-3株(JCM10015)である請求項8記載の形質転換体。

10. 請求項1～9のいずれか1項に記載の形質転換体を培養し、得られる培養物からポリエステルを採取することを特徴とする共重合ポリエステルの製造方法。

11. ポリエステルが、炭素数4～12の3-ヒドロキシアルカン酸ユニットからなる請求項10記載の共重合ポリエステルの製造方法。

12. 3-ヒドロキシアルカン酸ユニットが、80～95%のモル分率で3-ヒドロキシブタン酸を含むものである請求項11記載の共重合ポリエステルの製造方法。

図 1

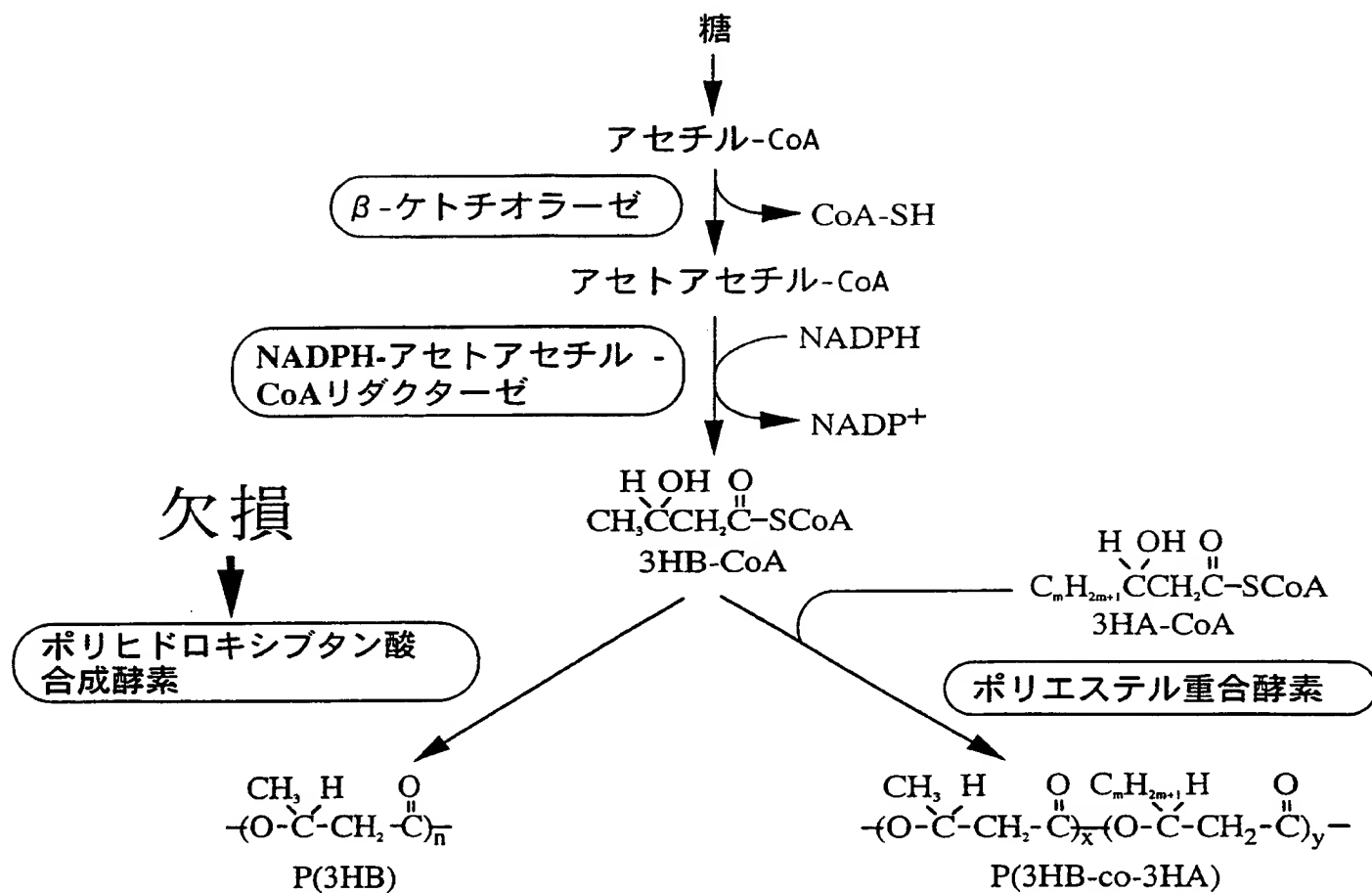


図 2

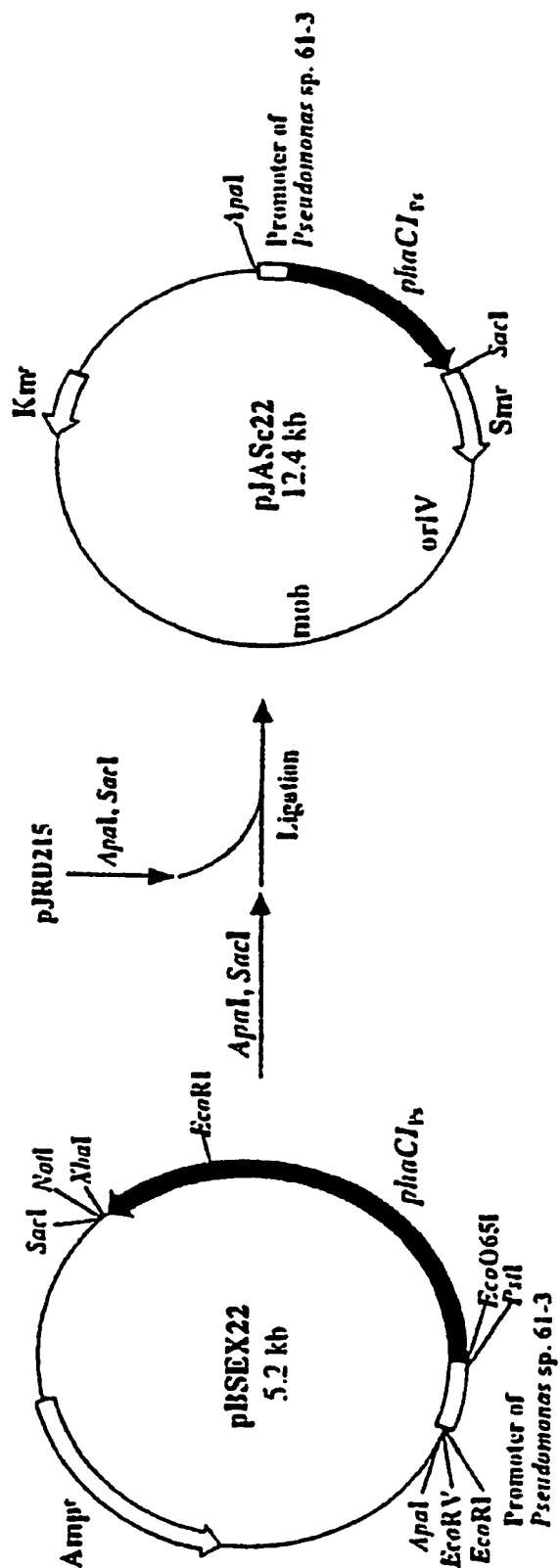


図 2

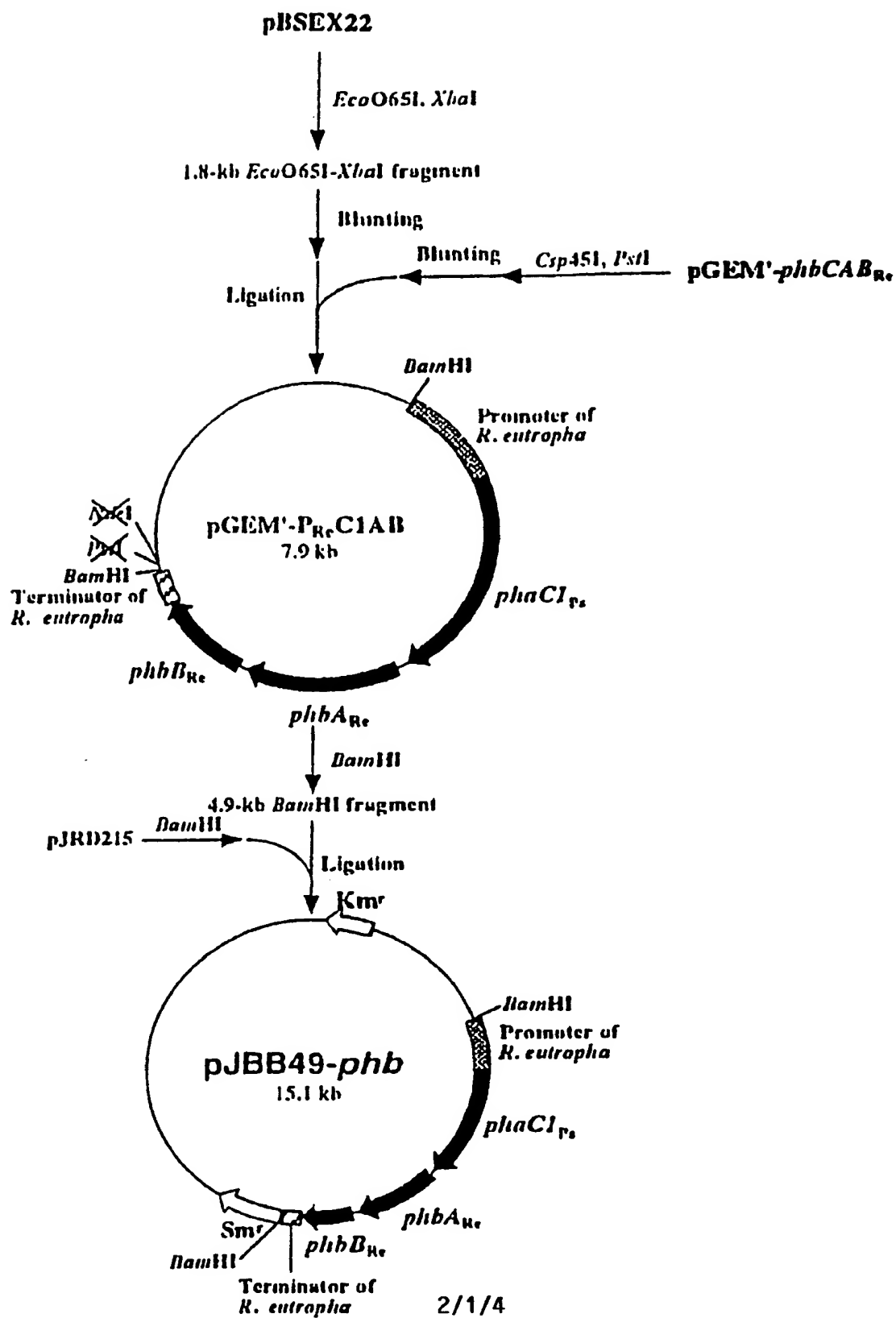


図 2

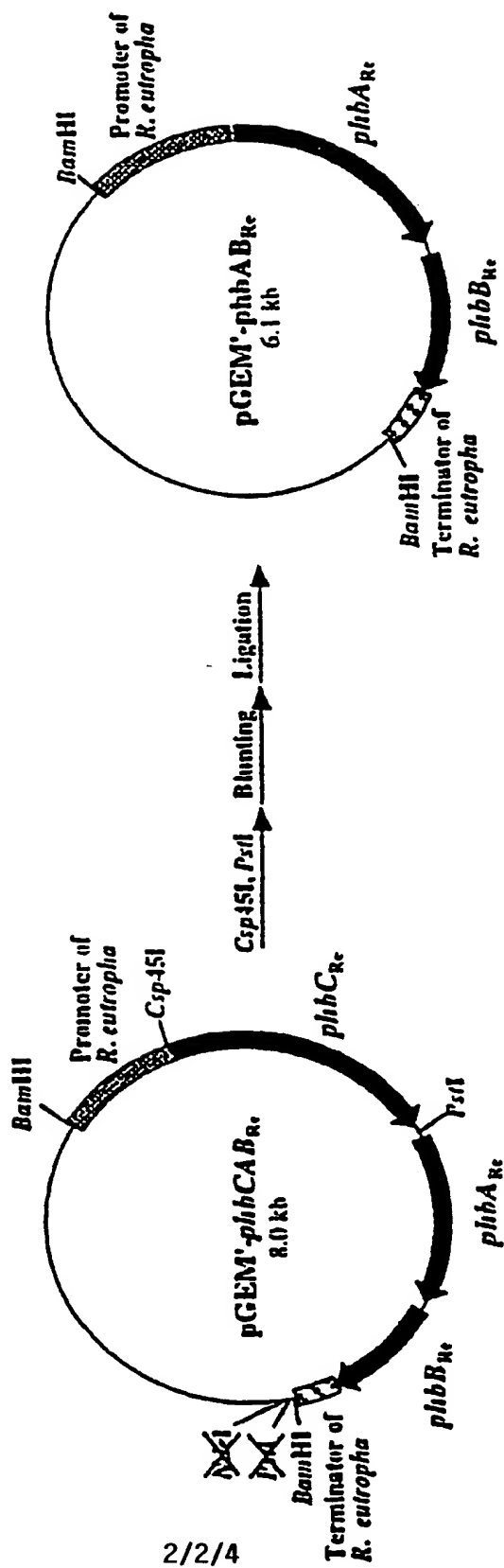


図 2

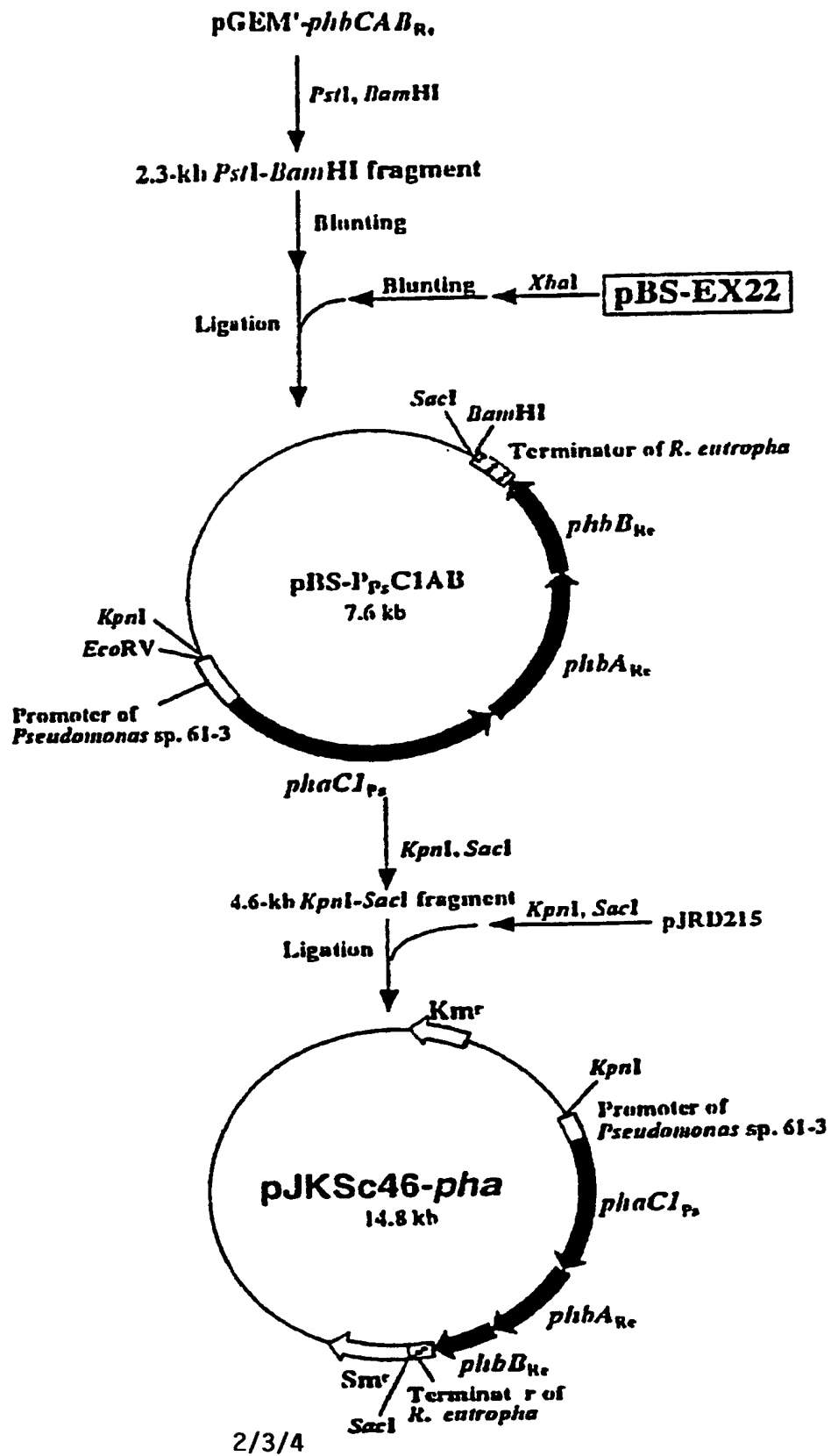


図 2

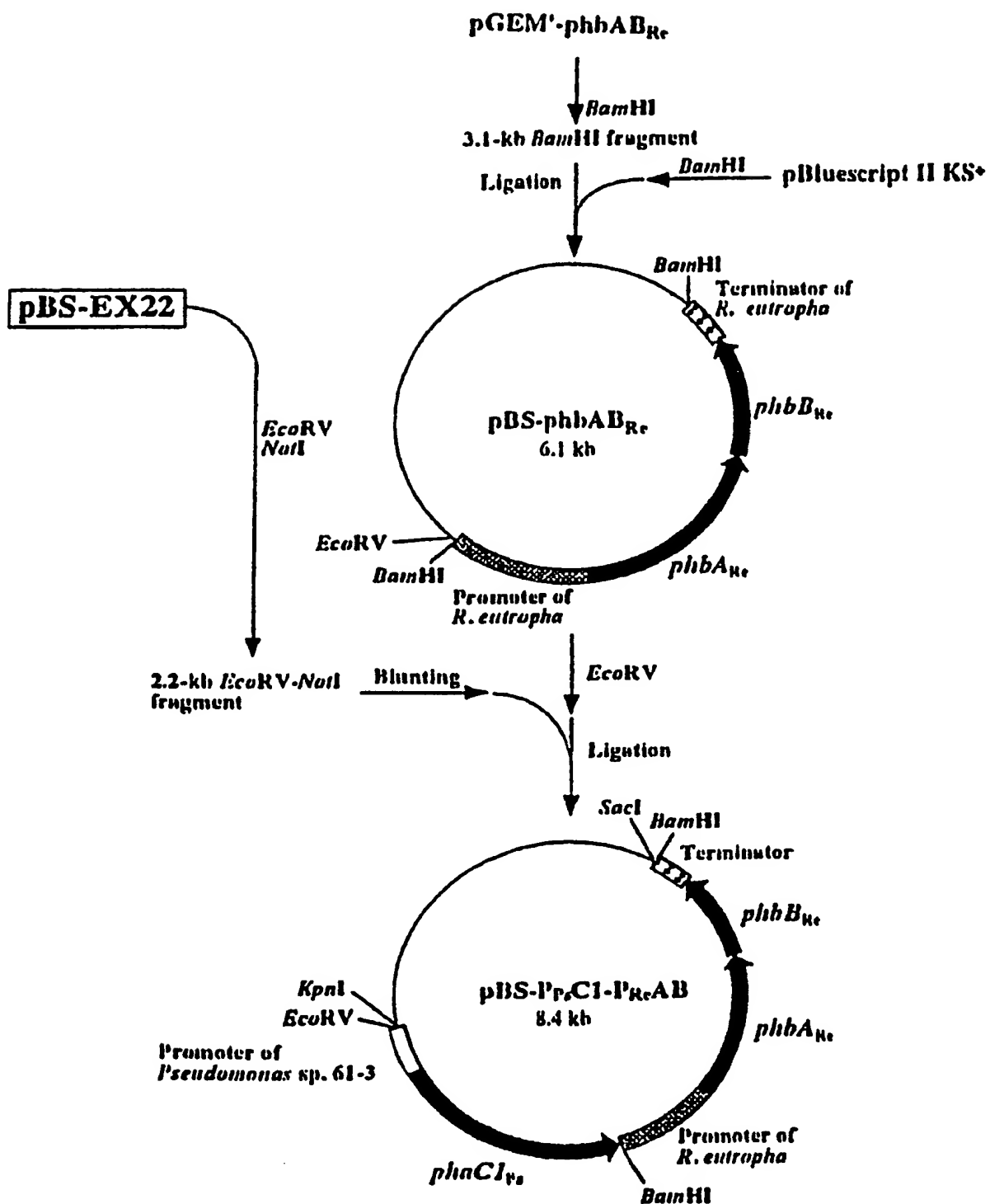


図 2

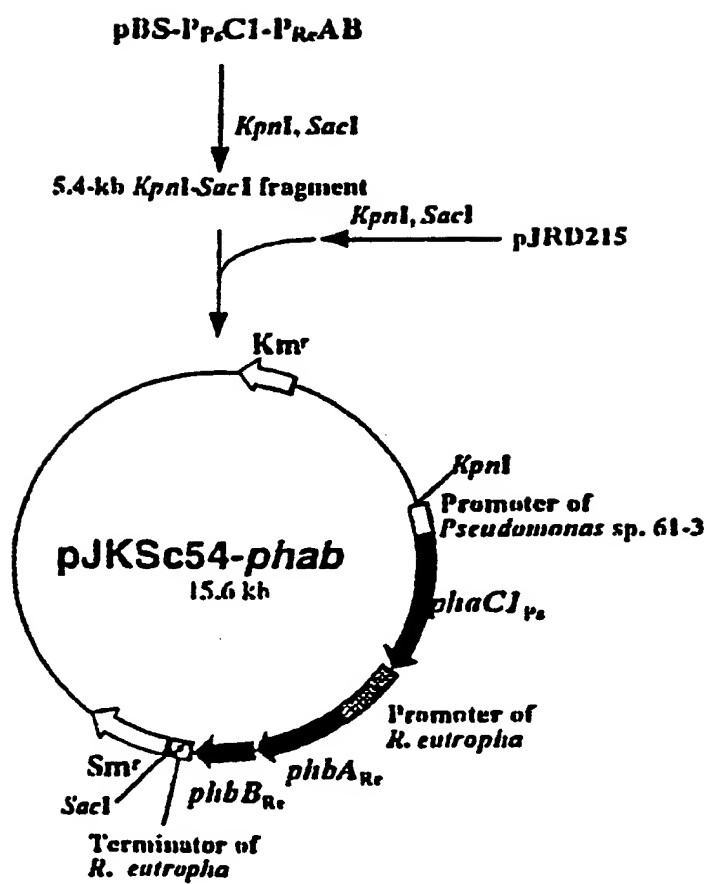


図 3

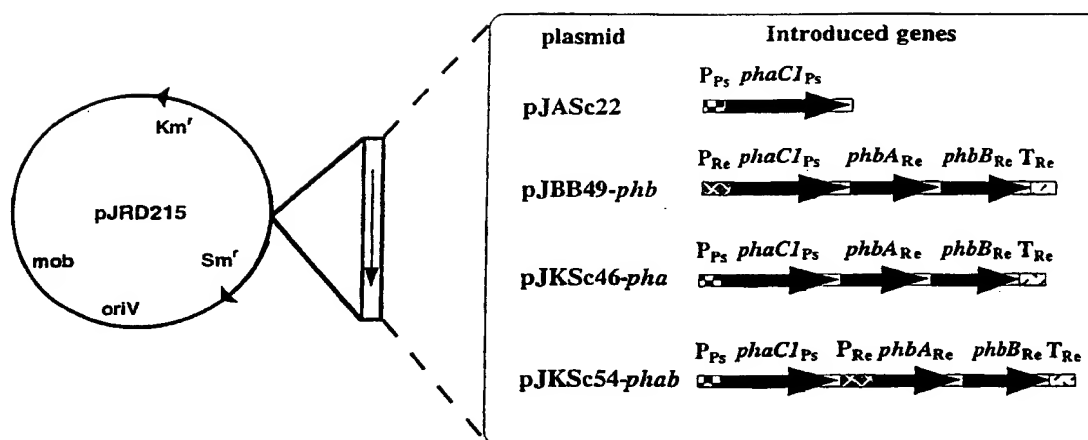
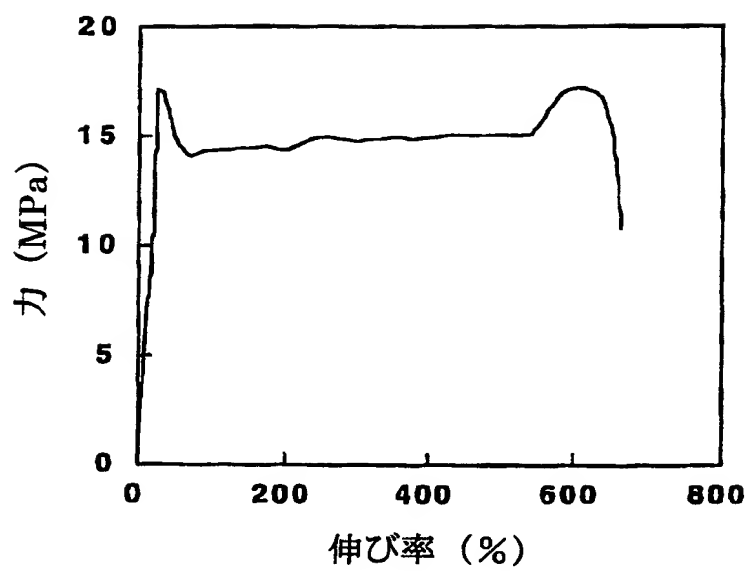




図 4



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Riken ; Japan Science and Technology Corporation
 <120> The method of production of copolymerized polyester
 <130> PH-1046-PCT
 <150> JP99/225102
 <151> 9-AUG-1999
 <160> 11
 <170> PatentIn Ver. 2.0
 <210> 1
 <211> 1680
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas sp. strain 61-3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1677)

<400> 1

| | |
|---|-----|
| atg agt aac aag aat agc gat gac ttg aat cgt caa gcc tcg gaa aac | 48 |
| Met Ser Asn Lys Asn Ser Asp Asp Leu Asn Arg Gln Ala Ser Glu Asn | |
| 1 5 10 15 | |
| acc ttg ggg ctt aac cct gtc atc ggc ctg cgt gga aaa gat ctg ctg | 96 |
| Thr Leu Gly Leu Asn Pro Val Ile Gly Leu Arg Gly Lys Asp Leu Leu | |
| 20 25 30 | |
| act tct gcc cga atg gtt tta acc caa gcc atc aaa caa ccc att cac | 144 |
| Thr Ser Ala Arg Met Val Leu Thr Gln Ala Ile Lys Gln Pro Ile His | |
| 35 40 45 | |
| agc gtc aag cac gtc gcg cat ttt ggc atc gag ctg aag aac gtg atg | 192 |

Ser Val Lys His Val Ala His Phe Gly Ile Glu Leu Lys Asn Val Met
 50 55 60
 ttt ggc aaa tcg aag ctg caa ccg gaa agc gat gac cgt cgt ttc aac 240
 Phe Gly Lys Ser Lys Leu Gln Pro Glu Ser Asp Asp Arg Arg Phe Asn
 65 70 75 80
 gac ccc gcc tgg agt cag aac cca ctc tac aaa cgt tat cta caa acc 288
 Asp Pro Ala Trp Ser Gln Asn Pro Leu Tyr Lys Arg Tyr Leu Gln Thr
 85 90 95
 tac ctg gcg tgg cgc aag gaa ctc cac gac tgg atc ggc aac agc aaa 336
 Tyr Leu Ala Trp Arg Lys Glu Leu His Asp Trp Ile Gly Asn Ser Lys
 100 105 110
 ctg tcc gaa cag gac atc aat cgc gct cac ttc gtg atc acc ctg atg 384
 Leu Ser Glu Gln Asp Ile Asn Arg Ala His Phe Val Ile Thr Leu Met
 115 120 125
 acc gaa gcc atg gcc ccg acc aac agt gcg gcc aat ccg gcg gcg gtc 432
 Thr Glu Ala Met Ala Pro Thr Asn Ser Ala Ala Asn Pro Ala Ala Val
 130 135 140
 aaa cgc ttc ttc gaa acc ggc ggt aaa agc ctg ctc gac ggc ctc aca 480
 Lys Arg Phe Phe Glu Thr Gly Gly Lys Ser Leu Leu Asp Gly Leu Thr
 145 150 155 160
 cat ctg gcc aag gac ctg gta aac aac ggc ggc atg ccg agc cag gtg 528
 His Leu Ala Lys Asp Leu Val Asn Asn Gly Gly Met Pro Ser Gln Val
 165 170 175
 gac atg ggc gct ttc gaa gtc ggc aag agt ctg ggg acg act gaa ggt 576
 Asp Met Gly Ala Phe Glu Val Gly Lys Ser Leu Gly Thr Thr Glu Gly
 180 185 190
 gca gtg gtt ttc cgc aac gac gtc ctc gaa ttg atc cag tac cgg ccg 624
 Ala Val Val Phe Arg Asn Asp Val Leu Glu Leu Ile Gln Tyr Arg Pro
 195 200 205

acc acc gaa cag gtg cat gag cga ccg ctg ctg gtg gtc cca ccg cag 672
 Thr Thr Glu Gln Val His Glu Arg Pro Leu Leu Val Val Pro Pro Gln
 210 215 220
 atc aac aag ttt tat gtg ttt gac ctg agc ccg gat aaa agc ctg gcg 720
 Ile Asn Lys Phe Tyr Val Phe Asp Leu Ser Pro Asp Lys Ser Leu Ala
 225 230 235 240
 cgc ttc tgc ctg agc aac aac cag caa acc ttt atc gtc agc tgg cgc 768
 Arg Phe Cys Leu Ser Asn Asn Gln Gln Thr Phe Ile Val Ser Trp Arg
 245 250 255
 aac ccg acc aag gcc cag cgt gag tgg ggt ctg tcg act tac atc gat 816
 Asn Pro Thr Lys Ala Gln Arg Glu Trp Gly Leu Ser Thr Tyr Ile Asp
 260 265 270
 gcg ctc aaa gaa gcc gtc gac gta gtt tcc gcc atc acc ggc agc aaa 864
 Ala Leu Lys Glu Ala Val Asp Val Val Ser Ala Ile Thr Gly Ser Lys
 275 280 285
 gac atc aac atg ctc ggc gcc tgc tcc ggt ggc att acc tgc acc gcg 912
 Asp Ile Asn Met Leu Gly Ala Cys Ser Gly Gly Ile Thr Cys Thr Ala
 290 295 300
 ctg ctg ggt cac tac gcc gct ctc ggc gag aag aag gtc aat gcc ctg 960
 Leu Leu Gly His Tyr Ala Ala Leu Gly Glu Lys Lys Val Asn Ala Leu
 305 310 315 320
 acc ctt ttg gtc agc gtg ctc gac acc acc ctc gac tcc cag gtt gca 1008
 Thr Leu Leu Val Ser Val Leu Asp Thr Thr Leu Asp Ser Gln Val Ala
 325 330 335
 ctg ttc gtc gat gag aaa acc ctg gaa gct gcc aag cgt cac tcg tat 1056
 Leu Phe Val Asp Glu Lys Thr Leu Glu Ala Ala Lys Arg His Ser Tyr
 340 345 350
 cag gcc ggc gtg ctg gaa ggc cgc gac atg gcc aaa gtc ttc gcc tgg 1104
 Gln Ala Gly Val Leu Glu Gly Arg Asp Met Ala Lys Val Phe Ala Trp

| | | | |
|---|-----|-----|------|
| 355 | 360 | 365 | |
| atg cgc cct aac gac ctg atc tgg aac tac tgg gtc aac aac tac ctg | | | 1152 |
| Met Arg Pro Asn Asp Leu Ile Trp Asn Tyr Trp Val Asn Asn Tyr Leu | | | |
| 370 | 375 | 380 | |
| ctg ggt aac gag cca ccg gtc ttc gac att ctt ttc tgg aac aac gac | | | 1200 |
| Leu Gly Asn Glu Pro Pro Val Phe Asp Ile Leu Phe Trp Asn Asn Asp | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| acc acc cgg ttg cct gct gcg ttc cac ggc gat ctg atc gaa atg ttc | | | 1248 |
| Thr Thr Arg Leu Pro Ala Ala Phe His Gly Asp Leu Ile Glu Met Phe | | | |
| 405 | 410 | 415 | |
| aaa aat aac cca ctg gtg cgc gcc aat gca ctc gaa gtg agc ggc acg | | | 1296 |
| Lys Asn Asn Pro Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Glu Val Ser Gly Thr | | | |
| 420 | 425 | 430 | |
| ccg atc gac ctc aaa cag gtc act gcc gac atc tac tcc ctg gcc ggc | | | 1344 |
| Pro Ile Asp Leu Lys Gln Val Thr Ala Asp Ile Tyr Ser Leu Ala Gly | | | |
| 435 | 440 | 445 | |
| acc aac gat cac atc acg ccc tgg aag tct tgc tac aag tcg gcg caa | | | 1392 |
| Thr Asn Asp His Ile Thr Pro Trp Lys Ser Cys Tyr Lys Ser Ala Gln | | | |
| 450 | 455 | 460 | |
| ctg ttc ggt ggc aag gtc gaa ttc gtg ctg tcc agc agt ggg cat atc | | | 1440 |
| Leu Phe Gly Gly Lys Val Glu Phe Val Leu Ser Ser Ser Gly His Ile | | | |
| 465 | 470 | 475 | 480 |
| cag agc att ctg aac ccg ccg ggc aat ccg aaa tca cgt tac atg acc | | | 1488 |
| Gln Ser Ile Leu Asn Pro Pro Gly Asn Pro Lys Ser Arg Tyr Met Thr | | | |
| 485 | 490 | 495 | |
| agc acc gac atg cca gcc acc gcc aac gag tgg caa gaa aac tca acc | | | 1536 |
| Ser Thr Asp Met Pro Ala Thr Ala Asn Glu Trp Gln Glu Asn Ser Thr | | | |
| 500 | 505 | 510 | |
| aag cac acc gac tcc tgg tgg ctg cac tgg cag gcc tgg cag gcc gag | | | 1584 |

Lys His Thr Asp Ser Trp Trp Leu His Trp Gln Ala Trp Gln Ala Glu
 515 520 525
 cgc tgc ggc aaa ctg aaa aag tcc ccg acc agc ctg ggc aac aag gcc 1632
 Arg Ser Gly Lys Leu Lys Lys Ser Pro Thr Ser Leu Gly Asn Lys Ala
 530 535 540
 tat ccg tca gga gaa gcc gcg ccg ggc acg tat gtg cat gaa cgt taa 1680
 Tyr Pro Ser Gly Glu Ala Ala Pro Gly Thr Tyr Val His Glu Arg
 545 550 555

<210> 2

<211> 559

<212> PRT

<213> Pseudomonas sp. strain 61-3

<400> 2

Met Ser Asn Lys Asn Ser Asp Asp Leu Asn Arg Gln Ala Ser Glu Asn
 1 5 10 15
 Thr Leu Gly Leu Asn Pro Val Ile Gly Leu Arg Gly Lys Asp Leu Leu
 20 25 30
 Thr Ser Ala Arg Met Val Leu Thr Gln Ala Ile Lys Gln Pro Ile His
 35 40 45
 Ser Val Lys His Val Ala His Phe Gly Ile Glu Leu Lys Asn Val Met
 50 55 60
 Phe Gly Lys Ser Lys Leu Gln Pro Glu Ser Asp Asp Arg Arg Phe Asn
 65 70 75 80
 Asp Pro Ala Trp Ser Gln Asn Pro Leu Tyr Lys Arg Tyr Leu Gln Thr
 85 90 95
 Tyr Leu Ala Trp Arg Lys Glu Leu His Asp Trp Ile Gly Asn Ser Lys
 100 105 110

Leu Ser Glu Gln Asp Ile Asn Arg Ala His Phe Val Ile Thr Leu Met
 115 120 125
 Thr Glu Ala Met Ala Pro Thr Asn Ser Ala Ala Asn Pro Ala Ala Val
 130 135 140
 Lys Arg Phe Phe Glu Thr Gly Gly Lys Ser Leu Leu Asp Gly Leu Thr
 145 150 155 160
 His Leu Ala Lys Asp Leu Val Asn Asn Gly Gly Met Pro Ser Gln Val
 165 170 175
 Asp Met Gly Ala Phe Glu Val Gly Lys Ser Leu Gly Thr Thr Glu Gly
 180 185 190
 Ala Val Val Phe Arg Asn Asp Val Leu Glu Leu Ile Gln Tyr Arg Pro
 195 200 205
 Thr Thr Glu Gln Val His Glu Arg Pro Leu Leu Val Val Pro Pro Gln
 210 215 220
 Ile Asn Lys Phe Tyr Val Phe Asp Leu Ser Pro Asp Lys Ser Leu Ala
 225 230 235 240
 Arg Phe Cys Leu Ser Asn Asn Gln Gln Thr Phe Ile Val Ser Trp Arg
 245 250 255
 Asn Pro Thr Lys Ala Gln Arg Glu Trp Gly Leu Ser Thr Tyr Ile Asp
 260 265 270
 Ala Leu Lys Glu Ala Val Asp Val Val Ser Ala Ile Thr Gly Ser Lys
 275 280 285
 Asp Ile Asn Met Leu Gly Ala Cys Ser Gly Gly Ile Thr Cys Thr Ala
 290 295 300
 Leu Leu Gly His Tyr Ala Ala Leu Gly Glu Lys Lys Val Asn Ala Leu
 305 310 315 320
 Thr Leu Leu Val Ser Val Leu Asp Thr Thr Leu Asp Ser Gln Val Ala
 325 330 335
 Leu Phe Val Asp Glu Lys Thr Leu Glu Ala Ala Lys Arg His Ser Tyr


```

          340              345              350
Gln Ala Gly Val Leu Glu Gly Arg Asp Met Ala Lys Val Phe Ala Trp
          355              360              365
Met Arg Pro Asn Asp Leu Ile Trp Asn Tyr Trp Val Asn Asn Tyr Leu
          370              375              380
Leu Gly Asn Glu Pro Pro Val Phe Asp Ile Leu Phe Trp Asn Asn Asp
385              390              395              400
Thr Thr Arg Leu Pro Ala Ala Phe His Gly Asp Leu Ile Glu Met Phe
          405              410              415
Lys Asn Asn Pro Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Glu Val Ser Gly Thr
          420              425              430
Pro Ile Asp Leu Lys Gln Val Thr Ala Asp Ile Tyr Ser Leu Ala Gly
          435              440              445
Thr Asn Asp His Ile Thr Pro Trp Lys Ser Cys Tyr Lys Ser Ala Gln
          450              455              460
Leu Phe Gly Gly Lys Val Glu Phe Val Leu Ser Ser Ser Gly His Ile
465              470              475              480
Gln Ser Ile Leu Asn Pro Pro Gly Asn Pro Lys Ser Arg Tyr Met Thr
          485              490              495
Ser Thr Asp Met Pro Ala Thr Ala Asn Glu Trp Gln Glu Asn Ser Thr
          500              505              510
Lys His Thr Asp Ser Trp Trp Leu His Trp Gln Ala Trp Gln Ala Glu
          515              520              525
Arg Ser Gly Lys Leu Lys Lys Ser Pro Thr Ser Leu Gly Asn Lys Ala
          530              535              540
Tyr Pro Ser Gly Glu Ala Ala Pro Gly Thr Tyr Val His Glu Arg
545              550              555

```

<210> 3

<211> 1683

<212> DNA

<213> Pseudomonas sp. strain 61-3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1680)

<400> 3

```

atg aga gag aaa cca acg ccg ggc ttg ctg ccc aca ccc gcg acg ttc      48
Met Arg Glu Lys Pro Thr Pro Gly Leu Leu Pro Thr Pro Ala Thr Phe
      1              5              10              15
atc aac gct cag agt gcg att acc ggt ctg cgc ggc cgg gat ctg ttc      96
Ile Asn Ala Gln Ser Ala Ile Thr Gly Leu Arg Gly Arg Asp Leu Phe
              20              25              30
tcg acc ctg cgc agc gtg gcc gcc cac ggc ctg cgt cac ccg gtg cgc      144
Ser Thr Leu Arg Ser Val Ala Ala His Gly Leu Arg His Pro Val Arg
              35              40              45
agc gcc cgt cat gtt ctg gca ctg ggc ggc cag ttg ggc cgc gtg ctg      192
Ser Ala Arg His Val Leu Ala Leu Gly Gly Gln Leu Gly Arg Val Leu
              50              55              60
ctg ggc gaa acg ctg cac acg ccg aac ccg aaa gac aat cgc ttt gcg      240
Leu Gly Glu Thr Leu His Thr Pro Asn Pro Lys Asp Asn Arg Phe Ala
              65              70              75              80
gac ccg acc tgg aga ctg aat ccg ttt tac cgg cgc agc ctg cag gcc      288
Asp Pro Thr Trp Arg Leu Asn Pro Phe Tyr Arg Arg Ser Leu Gln Ala
              85              90              95
tat ctg agc tgg cag aaa cag gtc aaa agc tgg atc gat gaa agc ggc      336
Tyr Leu Ser Trp Gln Lys Gln Val Lys Ser Trp Ile Asp Glu Ser Gly
              100              105              110

```



```

atg agt gac gat gac cgc gcc cgc gcg cat ttc gtc ttc gca ctg ctc 384
Met Ser Asp Asp Asp Arg Ala Arg Ala His Phe Val Phe Ala Leu Leu
      115              120              125
aat gac gcc gtg tcc ccc tcc aat acc ctg ctc aac ccg cta gcg atc 432
Asn Asp Ala Val Ser Pro Ser Asn Thr Leu Leu Asn Pro Leu Ala Ile
      130              135              140
aag gag ctg ttc aac tcc ggt ggc aac agc ctg gtc cgc ggt ctc agc 480
Lys Glu Leu Phe Asn Ser Gly Gly Asn Ser Leu Val Arg Gly Leu Ser
      145              150              155              160
cat tta ttc gac gac ctg atg cac aac aac ggg ctg ccc agt cag gtc 528
His Leu Phe Asp Asp Leu Met His Asn Asn Gly Leu Pro Ser Gln Val
      165              170              175
acc aaa cac gcc ttc gag att ggc aag acc gtg gca acc acc gcc ggg 576
Thr Lys His Ala Phe Glu Ile Gly Lys Thr Val Ala Thr Thr Ala Gly
      180              185              190
tcc gtg gtg ttt cgc aac gag ctg ctc gag ctg atg cag tac aag ccg 624
Ser Val Val Phe Arg Asn Glu Leu Leu Glu Leu Met Gln Tyr Lys Pro
      195              200              205
atg agc gaa aaa cag tac gcc aag ccg ttg ctg atc gtc ccg ccg cag 672
Met Ser Glu Lys Gln Tyr Ala Lys Pro Leu Leu Ile Val Pro Pro Gln
      210              215              220
att aac aag tac tac att ttc gac ctc agc ccg ggt aac agc ttc gtc 720
Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Phe Asp Leu Ser Pro Gly Asn Ser Phe Val
      225              230              235              240
cag tac gca ttg aag aat ggt ctg cag gtg ttc gtg gtc agc tgg cgt 768
Gln Tyr Ala Leu Lys Asn Gly Leu Gln Val Phe Val Val Ser Trp Arg
      245              250              255
aac ccg gat gtt cgc cac cgc gaa tgg ggc ctg tcc agt tac gtt gag 816
Asn Pro Asp Val Arg His Arg Glu Trp Gly Leu Ser Ser Tyr Val Glu

```



```

                260                      265                      270
gca ctg gaa gaa gca ctg aat gtt tgc cgc gct atc acc ggc gcg cgc 864
Ala Leu Glu Glu Ala Leu Asn Val Cys Arg Ala Ile Thr Gly Ala Arg

                275                      280                      285
gac gtc aat ctg atg ggc gcc tgt gct ggc ggc ctg acc atc gcg gct 912
Asp Val Asn Leu Met Gly Ala Cys Ala Gly Gly Leu Thr Ile Ala Ala

                290                      295                      300
ctg caa ggt cat ctg caa gcc aag cgg caa ctg cgg cgg gtc tcc agc 960
Leu Gln Gly His Leu Gln Ala Lys Arg Gln Leu Arg Arg Val Ser Ser

305                      310                      315                      320
gcc agc tac ctg gtc agc ctg ctg gat agc cag ata gac agc ccg gcg 1008
Ala Ser Tyr Leu Val Ser Leu Leu Asp Ser Gln Ile Asp Ser Pro Ala

                325                      330                      335
acg ttg ttc gcc gat gag cag acg ctg gaa gcc gcc aag cgc cat tcc 1056
Thr Leu Phe Ala Asp Glu Gln Thr Leu Glu Ala Ala Lys Arg His Ser

                340                      345                      350
tat caa cga ggt gtg ctc gag ggg cgc gac atg gcg aaa atc ttc gcc 1104
Tyr Gln Arg Gly Val Leu Glu Gly Arg Asp Met Ala Lys Ile Phe Ala

                355                      360                      365
tgg atg cgc ccc aat gac ctg atc tgg aac tac tgg gtc aac aac tac 1152
Trp Met Arg Pro Asn Asp Leu Ile Trp Asn Tyr Trp Val Asn Asn Tyr

                370                      375                      380
ctg ctg ggc aaa gaa ccg ccg gcc ttc gac att ctg tat tgg aac agt 1200
Leu Leu Gly Lys Glu Pro Pro Ala Phe Asp Ile Leu Tyr Trp Asn Ser

385                      390                      395                      400
gac aac acg cgc ctg cca gcg gca ttc cat ggc gac ctg ctg gac ttc 1248
Asp Asn Thr Arg Leu Pro Ala Ala Phe His Gly Asp Leu Leu Asp Phe

                405                      410                      415
ttc aag cac aat ccg ctg act cac ccc ggc ggg ctg gag gtc tgt ggc 1296

```


Phe Lys His Asn Pro Leu Thr His Pro Gly Gly Leu Glu Val Cys Gly
 420 425 430
 acg cct atc gat ttg cag aag gtc aac gta gac agc ttc agc gtg gcc 1344
 Thr Pro Ile Asp Leu Gln Lys Val Asn Val Asp Ser Phe Ser Val Ala
 435 440 445
 ggc atc aac gac cac atc act ccg tgg gac gcg gtg tac cgc tcg acc 1392
 Gly Ile Asn Asp His Ile Thr Pro Trp Asp Ala Val Tyr Arg Ser Thr
 450 455 460
 ctg ctg ctg ggt ggc gac cgg cgc ttc gta ctg tcc aac agc ggg cat 1440
 Leu Leu Leu Gly Gly Asp Arg Arg Phe Val Leu Ser Asn Ser Gly His
 465 470 475 480
 atc cag agc atc ctc aac ccg ccg agc aac ccc aag tcc aac tac atc 1488
 Ile Gln Ser Ile Leu Asn Pro Pro Ser Asn Pro Lys Ser Asn Tyr Ile
 485 490 495
 gag aac ccc aag ctc agt ggc gat cca cgc gcc tgg tat tac gac ggc 1536
 Glu Asn Pro Lys Leu Ser Gly Asp Pro Arg Ala Trp Tyr Tyr Asp Gly
 500 505 510
 acc cat gtc gaa ggt agc tgg tgg cca cgt tgg ctg agc tgg att cag 1584
 Thr His Val Glu Gly Ser Trp Trp Pro Arg Trp Leu Ser Trp Ile Gln
 515 520 525
 gag cgc tcc ggt acc caa cgc gaa acc ctg atg gcc ctt ggt aac cag 1632
 Glu Arg Ser Gly Thr Gln Arg Glu Thr Leu Met Ala Leu Gly Asn Gln
 530 535 540
 aac tat cca ccg atg gag gcg gcg cca ggt acc tac gtg cgc gtg cgc 1680
 Asn Tyr Pro Pro Met Glu Ala Ala Pro Gly Thr Tyr Val Arg Val Arg
 545 550 555 560
 tga 1683

<210> 4

<211> 560

<212> PRT

<213> Pseudomonas sp. strain 61-3

<400> 4

```

Met Arg Glu Lys Pro Thr Pro Gly Leu Leu Pro Thr Pro Ala Thr Phe
  1             5             10             15
Ile Asn Ala Gln Ser Ala Ile Thr Gly Leu Arg Gly Arg Asp Leu Phe
          20             25             30
Ser Thr Leu Arg Ser Val Ala Ala His Gly Leu Arg His Pro Val Arg
      35             40             45
Ser Ala Arg His Val Leu Ala Leu Gly Gly Gln Leu Gly Arg Val Leu
      50             55             60
Leu Gly Glu Thr Leu His Thr Pro Asn Pro Lys Asp Asn Arg Phe Ala
      65             70             75             80
Asp Pro Thr Trp Arg Leu Asn Pro Phe Tyr Arg Arg Ser Leu Gln Ala
          85             90             95
Tyr Leu Ser Trp Gln Lys Gln Val Lys Ser Trp Ile Asp Glu Ser Gly
      100             105             110
Met Ser Asp Asp Asp Arg Ala Arg Ala His Phe Val Phe Ala Leu Leu
      115             120             125
Asn Asp Ala Val Ser Pro Ser Asn Thr Leu Leu Asn Pro Leu Ala Ile
      130             135             140
Lys Glu Leu Phe Asn Ser Gly Gly Asn Ser Leu Val Arg Gly Leu Ser
      145             150             155             160
His Leu Phe Asp Asp Leu Met His Asn Asn Gly Leu Pro Ser Gln Val
          165             170             175
Thr Lys His Ala Phe Glu Ile Gly Lys Thr Val Ala Thr Thr Ala Gly
      180             185             190

```



```

Ser Val Val Phe Arg Asn Glu Leu Leu Glu Leu Met Gln Tyr Lys Pro
      195                200                205

Met Ser Glu Lys Gln Tyr Ala Lys Pro Leu Leu Ile Val Pro Pro Gln
      210                215                220

Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Phe Asp Leu Ser Pro Gly Asn Ser Phe Val
      225                230                235                240

Gln Tyr Ala Leu Lys Asn Gly Leu Gln Val Phe Val Val Ser Trp Arg
      245                250                255

Asn Pro Asp Val Arg His Arg Glu Trp Gly Leu Ser Ser Tyr Val Glu
      260                265                270

Ala Leu Glu Glu Ala Leu Asn Val Cys Arg Ala Ile Thr Gly Ala Arg
      275                280                285

Asp Val Asn Leu Met Gly Ala Cys Ala Gly Gly Leu Thr Ile Ala Ala
      290                295                300

Leu Gln Gly His Leu Gln Ala Lys Arg Gln Leu Arg Arg Val Ser Ser
      305                310                315                320

Ala Ser Tyr Leu Val Ser Leu Leu Asp Ser Gln Ile Asp Ser Pro Ala
      325                330                335

Thr Leu Phe Ala Asp Glu Gln Thr Leu Glu Ala Ala Lys Arg His Ser
      340                345                350

Tyr Gln Arg Gly Val Leu Glu Gly Arg Asp Met Ala Lys Ile Phe Ala
      355                360                365

Trp Met Arg Pro Asn Asp Leu Ile Trp Asn Tyr Trp Val Asn Asn Tyr
      370                375                380

Leu Leu Gly Lys Glu Pro Pro Ala Phe Asp Ile Leu Tyr Trp Asn Ser
      385                390                395                400

Asp Asn Thr Arg Leu Pro Ala Ala Phe His Gly Asp Leu Leu Asp Phe
      405                410                415

Phe Lys His Asn Pro Leu Thr His Pro Gly Gly Leu Glu Val Cys Gly

```



```

          420                      425                      430
Thr Pro Ile Asp Leu Gln Lys Val Asn Val Asp Ser Phe Ser Val Ala
          435                      440                      445
Gly Ile Asn Asp His Ile Thr Pro Trp Asp Ala Val Tyr Arg Ser Thr
          450                      455                      460
Leu Leu Leu Gly Gly Asp Arg Arg Phe Val Leu Ser Asn Ser Gly His
          465                      470                      475                      480
Ile Gln Ser Ile Leu Asn Pro Pro Ser Asn Pro Lys Ser Asn Tyr Ile
          485                      490                      495
Glu Asn Pro Lys Leu Ser Gly Asp Pro Arg Ala Trp Tyr Tyr Asp Gly
          500                      505                      510
Thr His Val Glu Gly Ser Trp Trp Pro Arg Trp Leu Ser Trp Ile Gln
          515                      520                      525
Glu Arg Ser Gly Thr Gln Arg Glu Thr Leu Met Ala Leu Gly Asn Gln
          530                      535                      540
Asn Tyr Pro Pro Met Glu Ala Ala Pro Gly Thr Tyr Val Arg Val Arg
          545                      550                      555                      560

```

<210> 5

<211> 1179

<212> DNA

<213> *Ralstonia eutropha*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1179)

<400> 5

atg act gac gtt gtc atc gta tcc gcc gcc cgc acc gcg gtc ggc aag 48

Met Thr Asp Val Val Ile Val Ser Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Lys
1 5 10 15
ttt ggc ggc tgc ctg gcc aag atc ccg gca ccg gaa ctg ggt gcc gtg 96
Phe Gly Gly Ser Leu Ala Lys Ile Pro Ala Pro Glu Leu Gly Ala Val
20 25 30
gtc atc aag gcc gcg ctg gag cgc gcc ggc gtc aag ccg gag cag gtg 144
Val Ile Lys Ala Ala Leu Glu Arg Ala Gly Val Lys Pro Glu Gln Val
35 40 45
agc gaa gtc atc atg ggc cag gtg ctg acc gcc ggt tgc ggc cag aac 192
Ser Glu Val Ile Met Gly Gln Val Leu Thr Ala Gly Ser Gly Gln Asn
50 55 60
ccc gca cgc cag gcc gcg atc aag gcc ggc ctg ccg gcg atg gtg ccg 240
Pro Ala Arg Gln Ala Ala Ile Lys Ala Gly Leu Pro Ala Met Val Pro
65 70 75 80
gcc atg acc atc aac aag gtg tgc ggc tgc ggc ctg aag gcc gtg atg 288
Ala Met Thr Ile Asn Lys Val Cys Gly Ser Gly Leu Lys Ala Val Met
85 90 95
ctg gcc gcc aac gcg atc atg gcg ggc gac gcc gag atc gtg gtg gcc 336
Leu Ala Ala Asn Ala Ile Met Ala Gly Asp Ala Glu Ile Val Val Ala
100 105 110
ggc ggc cag gaa aac atg agc gcc gcc ccg cac gtg ctg ccg ggc tgc 384
Gly Gly Gln Glu Asn Met Ser Ala Ala Pro His Val Leu Pro Gly Ser
115 120 125
cgc gat ggt ttc cgc atg ggc gat gcc aag ctg gtc gac acc atg atc 432
Arg Asp Gly Phe Arg Met Gly Asp Ala Lys Leu Val Asp Thr Met Ile
130 135 140
gtc gac ggc ctg tgg gac gtg tac aac cag tac cac atg ggc atc acc 480
Val Asp Gly Leu Trp Asp Val Tyr Asn Gln Tyr His Met Gly Ile Thr
145 150 155 160


```

gcc gag aac gtg gcc aag gaa tac ggc atc aca cgc gag gcg cag gat 528
Ala Glu Asn Val Ala Lys Glu Tyr Gly Ile Thr Arg Glu Ala Gln Asp
      165              170              175

gag ttc gcc gtc ggc tgc cag aac aag gcc gaa gcc gcg cag aag gcc 576
Glu Phe Ala Val Gly Ser Gln Asn Lys Ala Glu Ala Ala Gln Lys Ala
      180              185              190

ggc aag ttt gac gaa gag atc gtc ccg gtg ctg atc ccg cag cgc aag 624
Gly Lys Phe Asp Glu Glu Ile Val Pro Val Leu Ile Pro Gln Arg Lys
      195              200              205

ggc gac ccg gtg gcc ttc aag acc gac gag ttc gtg cgc cag ggc gcc 672
Gly Asp Pro Val Ala Phe Lys Thr Asp Glu Phe Val Arg Gln Gly Ala
      210              215              220

acg ctg gac agc atg tcc ggc ctc aag ccc gcc ttc gac aag gcc ggc 720
Thr Leu Asp Ser Met Ser Gly Leu Lys Pro Ala Phe Asp Lys Ala Gly
225              230              235              240

acg gtg acc gcg gcc aac gcc tgc ggc ctg aac gac ggc gcc gcc gcg 768
Thr Val Thr Ala Ala Asn Ala Ser Gly Leu Asn Asp Gly Ala Ala Ala
      245              250              255

gtg gtg gtg atg tgc gcg gcc aag gcc aag gaa ctg ggc ctg acc ccg 816
Val Val Val Met Ser Ala Ala Lys Ala Lys Glu Leu Gly Leu Thr Pro
      260              265              270

ctg gcc acg atc aag agc tat gcc aac gcc ggt gtc gat ccc aag gtg 864
Leu Ala Thr Ile Lys Ser Tyr Ala Asn Ala Gly Val Asp Pro Lys Val
      275              280              285

atg ggc atg ggc ccg gtg ccg gcc tcc aag cgc gcc ctg tgc cgc gcc 912
Met Gly Met Gly Pro Val Pro Ala Ser Lys Arg Ala Leu Ser Arg Ala
      290              295              300

gag tgg acc ccg caa gac ctg gac ctg atg gag atc aac gag gcc ttt 960
Glu Trp Thr Pro Gln Asp Leu Asp Leu Met Glu Ile Asn Glu Ala Phe

```



```

305              310              315              320
gcc gcg cag gcg ctg gcg gtg cac cag cag atg ggc tgg gac acc tcc 1008
Ala Ala Gln Ala Leu Ala Val His Gln Gln Met Gly Trp Asp Thr Ser

              325              330              335
aag gtc aat gtg aac ggc ggc gcc atc gcc atc ggc cac ccg atc ggc 1056
Lys Val Asn Val Asn Gly Gly Ala Ile Ala Ile Gly His Pro Ile Gly

              340              345              350
gcg tcg ggc tgc cgt atc ctg gtg acg ctg ctg cac gag atg aag cgc 1104
Ala Ser Gly Cys Arg Ile Leu Val Thr Leu Leu His Glu Met Lys Arg

              355              360              365
cgt gac gcg aag aag ggc ctg gcc tcg ctg tgc atc ggc ggc ggc atg 1152
Arg Asp Ala Lys Lys Gly Leu Ala Ser Leu Cys Ile Gly Gly Gly Met

              370              375              380
ggc gtg gcg ctg gca gtc gag cgc aaa 1179
Gly Val Ala Leu Ala Val Glu Arg Lys

385              390

```

<210> 6

<211> 393

<212> PRT

<213> *Ralstonia eutropha*

<400> 6

Met Thr Asp Val Val Ile Val Ser Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Lys

1

5

10

15

Phe Gly Gly Ser Leu Ala Lys Ile Pro Ala Pro Glu Leu Gly Ala Val

20

25

30

Val Ile Lys Ala Ala Leu Glu Arg Ala Gly Val Lys Pro Glu Gln Val

35

40

45

Ser Glu Val Ile Met Gly Gln Val Leu Thr Ala Gly Ser Gly Gln Asn
 50 55 60
 Pro Ala Arg Gln Ala Ala Ile Lys Ala Gly Leu Pro Ala Met Val Pro
 65 70 75 80
 Ala Met Thr Ile Asn Lys Val Cys Gly Ser Gly Leu Lys Ala Val Met
 85 90 95
 Leu Ala Ala Asn Ala Ile Met Ala Gly Asp Ala Glu Ile Val Val Ala
 100 105 110
 Gly Gly Gln Glu Asn Met Ser Ala Ala Pro His Val Leu Pro Gly Ser
 115 120 125
 Arg Asp Gly Phe Arg Met Gly Asp Ala Lys Leu Val Asp Thr Met Ile
 130 135 140
 Val Asp Gly Leu Trp Asp Val Tyr Asn Gln Tyr His Met Gly Ile Thr
 145 150 155 160
 Ala Glu Asn Val Ala Lys Glu Tyr Gly Ile Thr Arg Glu Ala Gln Asp
 165 170 175
 Glu Phe Ala Val Gly Ser Gln Asn Lys Ala Glu Ala Ala Gln Lys Ala
 180 185 190
 Gly Lys Phe Asp Glu Glu Ile Val Pro Val Leu Ile Pro Gln Arg Lys
 195 200 205
 Gly Asp Pro Val Ala Phe Lys Thr Asp Glu Phe Val Arg Gln Gly Ala
 210 215 220
 Thr Leu Asp Ser Met Ser Gly Leu Lys Pro Ala Phe Asp Lys Ala Gly
 225 230 235 240
 Thr Val Thr Ala Ala Asn Ala Ser Gly Leu Asn Asp Gly Ala Ala Ala
 245 250 255
 Val Val Val Met Ser Ala Ala Lys Ala Lys Glu Leu Gly Leu Thr Pro
 260 265 270
 Leu Ala Thr Ile Lys Ser Tyr Ala Asn Ala Gly Val Asp Pro Lys Val


```

      275              280              285
Met Gly Met Gly Pro Val Pro Ala Ser Lys Arg Ala Leu Ser Arg Ala
      290              295              300
Glu Trp Thr Pro Gln Asp Leu Asp Leu Met Glu Ile Asn Glu Ala Phe
      305              310              315              320
Ala Ala Gln Ala Leu Ala Val His Gln Gln Met Gly Trp Asp Thr Ser
              325              330              335
Lys Val Asn Val Asn Gly Gly Ala Ile Ala Ile Gly His Pro Ile Gly
              340              345              350
Ala Ser Gly Cys Arg Ile Leu Val Thr Leu Leu His Glu Met Lys Arg
              355              360              365
Arg Asp Ala Lys Lys Gly Leu Ala Ser Leu Cys Ile Gly Gly Gly Met
              370              375              380
Gly Val Ala Leu Ala Val Glu Arg Lys
      385              390

```

<210> 7

<211> 738

<212> DNA

<213> *Ralstonia eutropha*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(738)

<400> 7

```

atg act cag cgc att gcg tat gtg acc ggc ggc atg ggt ggt atc gga 48
Met Thr Gln Arg Ile Ala Tyr Val Thr Gly Gly Met Gly Gly Ile Gly

```

1

5

10

15


```

acc gcc att tgc cag cgg ctg gcc aag gat ggc ttt cgt gtg gtg gcc 96
Thr Ala Ile Cys Gln Arg Leu Ala Lys Asp Gly Phe Arg Val Val Ala
      20              25              30

ggg tgc ggc ccc aac tcg ccg cgc cgc gaa aag tgg ctg gag cag cag 144
Gly Cys Gly Pro Asn Ser Pro Arg Arg Glu Lys Trp Leu Glu Gln Gln
      35              40              45

aag gcc ctg ggc ttc gat ttc att gcc tcg gaa ggc aat gtg gct gac 192
Lys Ala Leu Gly Phe Asp Phe Ile Ala Ser Glu Gly Asn Val Ala Asp
      50              55              60

tgg gac tcg acc aag acc gca ttc gac aag gtc aag tcc gag gtc ggc 240
Trp Asp Ser Thr Lys Thr Ala Phe Asp Lys Val Lys Ser Glu Val Gly
      65              70              75              80

gag gtt gat gtg ctg atc aac aac gcc ggt atc acc cgc gac gtg gtg 288
Glu Val Asp Val Leu Ile Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Val Val
      85              90              95

ttc cgc aag atg acc cgc gcc gac tgg gat gcg gtg atc gac acc aac 336
Phe Arg Lys Met Thr Arg Ala Asp Trp Asp Ala Val Ile Asp Thr Asn
     100             105             110

ctg acc tcg ctg ttc aac gtc acc aag cag gtg atc gac ggc atg gcc 384
Leu Thr Ser Leu Phe Asn Val Thr Lys Gln Val Ile Asp Gly Met Ala
     115             120             125

gac cgt ggc tgg ggc cgc atc gtc aac atc tcg tcg gtg aac ggg cag 432
Asp Arg Gly Trp Gly Arg Ile Val Asn Ile Ser Ser Val Asn Gly Gln
     130             135             140

aag ggc cag ttc ggc cag acc aac tac tcc acc gcc aag gcc ggc ctg 480
Lys Gly Gln Phe Gly Gln Thr Asn Tyr Ser Thr Ala Lys Ala Gly Leu
     145             150             155             160

cat ggc ttc acc atg gca ctg gcg cag gaa gtg gcg acc aag ggc gtg 528
His Gly Phe Thr Met Ala Leu Ala Gln Glu Val Ala Thr Lys Gly Val

```



```

                165                170                175
acc gtc aac acg gtc tct ccg ggc tat atc gcc acc gac atg gtc aag 576
Thr Val Asn Thr Val Ser Pro Gly Tyr Ile Ala Thr Asp Met Val Lys

                180                185                190
gcg atc cgc cag gac gtg ctc gac aag atc gtc gcg acg atc ccg gtc 624
Ala Ile Arg Gln Asp Val Leu Asp Lys Ile Val Ala Thr Ile Pro Val

                195                200                205
aag cgc ctg ggc ctg ccg gaa gag atc gcc tcg atc tgc gcc tgg ttg 672
Lys Arg Leu Gly Leu Pro Glu Glu Ile Ala Ser Ile Cys Ala Trp Leu

                210                215                220
tcg tcg gag gag tcc ggt ttc tcg acc ggc gcc gac ttc tcg ctc aac 720
Ser Ser Glu Glu Ser Gly Phe Ser Thr Gly Ala Asp Phe Ser Leu Asn

225                230                235                240
ggc ggc ctg cat atg ggc 738
Gly Gly Leu His Met Gly

                245

```

<210> 8

<211> 246

<212> PRT

<213> *Ralstonia eutropha*

<400> 8

```

Met Thr Gln Arg Ile Ala Tyr Val Thr Gly Gly Met Gly Gly Ile Gly
  1                5                10                15
Thr Ala Ile Cys Gln Arg Leu Ala Lys Asp Gly Phe Arg Val Val Ala
                20                25                30
Gly Cys Gly Pro Asn Ser Pro Arg Arg Glu Lys Trp Leu Glu Gln Gln
                35                40                45

```


Lys Ala Leu Gly Phe Asp Phe Ile Ala Ser Glu Gly Asn Val Ala Asp
 50 55 60
 Trp Asp Ser Thr Lys Thr Ala Phe Asp Lys Val Lys Ser Glu Val Gly
 65 70 75 80
 Glu Val Asp Val Leu Ile Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Val Val
 85 90 95
 Phe Arg Lys Met Thr Arg Ala Asp Trp Asp Ala Val Ile Asp Thr Asn
 100 105 110
 Leu Thr Ser Leu Phe Asn Val Thr Lys Gln Val Ile Asp Gly Met Ala
 115 120 125
 Asp Arg Gly Trp Gly Arg Ile Val Asn Ile Ser Ser Val Asn Gly Gln
 130 135 140
 Lys Gly Gln Phe Gly Gln Thr Asn Tyr Ser Thr Ala Lys Ala Gly Leu
 145 150 155 160
 His Gly Phe Thr Met Ala Leu Ala Gln Glu Val Ala Thr Lys Gly Val
 165 170 175
 Thr Val Asn Thr Val Ser Pro Gly Tyr Ile Ala Thr Asp Met Val Lys
 180 185 190
 Ala Ile Arg Gln Asp Val Leu Asp Lys Ile Val Ala Thr Ile Pro Val
 195 200 205
 Lys Arg Leu Gly Leu Pro Glu Glu Ile Ala Ser Ile Cys Ala Trp Leu
 210 215 220
 Ser Ser Glu Glu Ser Gly Phe Ser Thr Gly Ala Asp Phe Ser Leu Asn
 225 230 235 240
 Gly Gly Leu His Met Gly
 245

<210> 9

<211> 542

<212> DNA

<213> Pseudomonas sp. strain 61-3

<400> 9

gaattcttgc gcgtagcatic tccttccgcc gaagtcagg gccacggcaa acctatcctg 60
 caatttggca agatcggcgt aggcctgaac aagglagaac cggccgggtca gtacgcactg 120
 aaattgacct tcgacgacgg ccatgacagc ggccctgttca cctgggatta tctgtaccaa 180
 ctggcacaac gtcaggaagc actttgggca gattatcttg cagaactcaa agcggctgga 240
 aagtcgccg acccaagcga atccatcgtc aagctgatgc tctaattcag gcctcttgc 300
 ctttagaggg cattttctaa ttcatctgt ttgaatgctc cgtgtgtcgg caagcgattg 360
 gcctgcttgc gaaaaaaaaa aaactcgggt aaccaatgga gctggcaagt tccctgcagt 420
 gctctctgaa ctagaaagca acgttgtgca attaacggtc acccgagcag tagtacctgg 480
 cggttgctgt gtgactacac agctgggtccc ggtactcgtc tcaggacaat ggagcgtcgt 540
 ag 542

<210> 10

<211> 841

<212> DNA

<213> Ralstonia eutropha

<400> 10

cccgggcaag taccttgccg acatctatgc gctggcgcg acgcgcctgg cgcgcgccgg 60
 ctgtaccgag gtctacggcg gcgacgcctg caccgtggcc gacgccggtc gcttctactc 120
 ctatcggcgc gatggcgatga cggcccgcat ggccagcctg gtctggcttg cggactgagc 180
 ccgccgctgc ctcaactcgtc cttgccccctg gccgcctgcg cgcgctcggc ttcagccttg 240
 cgtcggcggc ggccgggcgt gcccatgatg tagagcacca cgccaccggc gccatgccat 300
 acatcaggaa ggtggcaacg cctgccacca cgttgtgtc ggtgatcgcc atcatcagcg 360
 ccacgtagag ccagccaatg gccacgatgt acatcaaaaa ttcatccttc tcgcctatgc 420
 tctggggcct cggcagatgc gagcgtgca taccgtccgg taggtcggga agcgtgcagt 480

gccgaggcgg attcccgcat tgacagcgcg tgcgttgcaa ggcaacaatg gactcaaatg 540
tctcggaatc gctgacgatt cccaggtttc tccggcaagc atagcgcatg gcgtctccat 600
gcgagaaatgt cgcgcttgcc ggataaaaagg ggagccgcta tcggaatgga cgcaagccac 660
ggccgcagca ggtgcggtcg agggcttcca gccagttcca gggcagatgt gccggcagac 720
cctccccgctt tgggggaggc gcaagccggg tccattcgga tagcatctcc ccatgcaaag 780
tgccggccag ggcaatgccc ggagccggtt cgaatagtga cggcagagag acaatcaaat 840
c 841

<210> 11

<211> 292

<212> DNA

<213> *Ralstonia eutropha*

<400> 11

cctgccggcc tggttcaacc agtcggcagc cggcgctggc gcccgcgtat tgcggtgcag 60
ccagcgcggc gcacaaggcg gcgggcgttt cgtttcgccg cccgtttcgc gggccgtcaa 120
ggcccgcgaa tcgtttctgc ccgcgcggca ttctctgctt tttgcgccaa ttcaccgggt 180
tttctttaag ccccgtcgct ttcttagtg ccttggtggg catagaatca gggcagcggc 240
gcagccagca ccatgttcgt gcagcgcggc cctcgcgggg gcgaggctgc ag 292

